

Biotechnische 2,3-Butandiol-Produktion aus Birkenholz-Hemicellulose

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften

der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig

zur Erlangung des Grades

einer Doktorin der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

genehmigte

D i s s e r t a t i o n

von Malee Kristin Kallbach
aus Hannover

1. Referent: Privatdozent Dr. Ulf Christian Prüße
2. Referentin: Professorin Dr. Anett Schallmey
eingereicht am: 03.04.2018
mündliche Prüfung (Disputation) am: 27.06.2018

Druckjahr 2018

Vorveröffentlichungen der Dissertation

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Fakultät für Lebenswissenschaften, vertreten durch den Mentor der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Publikationen

Kallbach, M., Horn, S., Kuenz, A., Prüße, U. Screening of novel bacteria for the 2,3-butanediol production. Appl. Microbiol. Biotechnol 101: 1025-1033 (2017).

Tagungsbeiträge

Kallbach, M., Kuenz, A., Prüße, U. Neuer Stamm zur biotechnischen Umsetzung von Xylose zu 2,3-Butandiol. (Tagungsbeitrag) ProcessNet-Jahrestagung und 32. DECHEMA-Jahrestagung der Biotechnologen, Aachen, Deutschland (2016).

Kallbach, M., Staude, C., Prüße, U. Biotechnical and chemical conversion of xylose to 2,3-butanediol, furfural and maleic acid. (Tagungsbeitrag) International Symposium on Green Chemistry (ISGC-2017), La Rochelle, Frankreich (2017).

Posterbeiträge

Kallbach, M., Kuenz, A., Hevekerl, A., Prüße, U. Microorganism screening for the conversion of xylose to 2,3-butanediol. (Poster) ECCE10+ECAB3+EPIC5, Nizza, Frankreich (2015).

Kallbach, M., Kuenz, A., Prüße, U. Conversion of xylose to 2,3-butanediol with a screened *Bacillus* ssp. Strain. (Poster). 12th International Conference on Renewable Resources & Biorefineries, Gent, Belgien (2016).

Kallbach, M., Drewes, S., Niemi, H., Kallioinen, M., Mänttari, M., Kuenz, A., Prüße, U. Conversion of xylose from birch hemicellulose hydrolysate to 2,3-butanediol with *Bacillus vallismortis*. (Poster). 7th Nordic Wood Biorefinery Conference 2017, Stockholm, Schweden (2017).

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	III
Abkürzungsverzeichnis.....	VII
1 Einleitung und Zielsetzung.....	1
2 Theoretische Grundlagen	3
2.1 2,3-Butandiol	3
2.1.1 Mikroorganismen	4
2.1.2 Stoffwechsel der gemischten Säuregärung	4
2.1.3 Physiologischer Nutzen	6
2.1.4 Einfluss des pH-Wertes auf die 2,3-Butandiol-Produktion.....	7
2.1.5 Einfluss des Sauerstoffgehaltes auf die 2,3-Butandiol-Produktion	9
2.1.6 Kohlenstoffquelle	10
2.1.7 Theoretische Ausbeuten für Hexosen und Pentosen.....	12
2.1.8 Einfluss der initialen Substratkonzentration	12
2.2 Lignocellulosehaltige Biomasse	13
2.2.1 Cellulose.....	14
2.2.2 Hemicellulose	14
2.2.3 Lignin.....	15
2.2.4 Nebenprodukte aus lignocellulosehaltiger Biomasse	15
3 Material und Methoden	19
3.1 Chemikalien.....	19
3.2 Bakterienstämme	19
3.3 Medien	20
3.3.1 Nutrient-Medium.....	21
3.3.2 Nährstoffagarplatten	21
3.3.3 Defined-Medium.....	21
3.3.4 MRS-Medium	22
3.3.5 MS-Medium	22
3.3.6 <i>Bacillus thermoglucosidasius</i> Medium	23
3.3.7 Basal-Medium.....	23
3.3.8 Modifiziertes Basal-Medium (Basal-HE-Medium)	24
3.3.9 Modifiziertes Basal-HE-Medium für <i>Bacillus mojavensis</i>	24

3.3.10	Synthetisches Hydrolysat.....	25
3.4	Stammhaltung und Kultivierung.....	26
3.4.1	Kryokonservierung.....	26
3.4.2	Vorkulturen.....	26
3.4.3	Kultivierungen in der Mikrotiterplatte	26
3.4.4	Kultivierungen im Schüttelkolben	27
3.4.5	Kultivierungen im DASbox [®] Reaktorsystem.....	27
3.5	Screening nach neuen 2,3-Butandiol Produzenten.....	29
3.6	Einsatz von Xylan und Hemicellulose als Kohlenstoffquelle.....	30
3.6.1	Enzymatischer Aufschluss von Birkenholz-Hemicellulose-Hydrolysat	30
3.6.2	Säureaufschluss von Birkenholz-Hemicellulose-Hydrolysat.....	30
3.6.3	Xylane als Modells substrat	31
3.6.4	Hemicellulose aus Birkenholz	32
3.6.5	Detoxifizierung von Birkenholz-Hemicellulose-Hydrolysat	34
3.6.5.1	Anionentauscher.....	34
3.6.5.2	Umkehrphase (RP-Phase)	36
3.6.5.3	Flüssig-Flüssig-Extraktion.....	36
3.7	Einsatz unterschiedlicher Stickstoffquellen.....	38
3.7.1	Vitaminzusatz	38
3.7.2	Aminosäurezusatz.....	39
3.8	Analytische Methoden	40
3.8.1	Optische Dichte	40
3.8.2	Biotrockenmasse	41
3.8.3	Online Bestimmung der C-Quellen-Limitierung und dem Kultivierungsende..	41
3.8.4	Voges-Proskauer-Test.....	43
3.8.5	Aminosäurebestimmung mittels EZ:faast [®] und Gaschromatographie mit Flammenionisationsdetektor	43
3.8.6	Hochdruckflüssigkeitschromatographie.....	44
3.8.6.1	Bestimmung von Substraten, Produkten und Nebenprodukten	44
3.8.6.2	Bestimmung von Nebenprodukten in Holz-Hydrolysaten	45
3.8.7	Ionenaustauschchromatographie mit gekoppelter amperometrischer Detektion zur Bestimmung von Monosacchariden	46
3.8.8	Optische Emissionsspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma.....	48

3.8.9	Ionenchromatographie.....	50
3.8.10	Gaschromatographie zur Bestimmung der 2,3-Butandiol-Stereoisomere	50
4	Ergebnisse und Diskussion	52
4.1	Primäres Screening	52
4.1.1	Phylogenetisches Screening	52
4.1.1.1	Medienwahl.....	54
4.1.1.2	Charakterisierung der phylogenetischen Screening-Stämme.....	57
4.1.1.3	Bestimmung der maximalen Kultivierungstemperatur	62
4.1.1.4	Bestimmung der 2,3-Butandiol-Stereoisomere	66
4.1.2	Screening aus natürlichen Umweltproben.....	67
4.1.3	Evaluierung der Screeningstämme hinsichtlich der Produktion von 2,3-Butandiol aus synthetischen Hydrolysaten	70
4.1.3.1	Wahl eines pH-Puffersystems.....	71
4.1.3.2	Vergleich der 2,3-Butandiolproduktion mit Glucose.....	72
4.1.3.3	Vergleich der 2,3-Butandiol-Produktion mit Xylose	73
4.1.3.4	Einfluss von Holz-Hydrolysatnebenprodukten auf die Produktbildung	74
4.1.4	Zusammenfassung des primären Screenings	78
4.2	Sekundäres Screening der Stämme <i>B. atrophaeus</i> NRS-213, <i>B. mojavensis</i> B-14698 und <i>B. vallismortis</i> B-14891.....	79
4.2.1	Substratscreening	79
4.2.2	Kultivierung mit Xylan.....	82
4.2.3	Variation der Medienzusammensetzung	87
4.2.4	Maximale initiale Glucosekonzentration.....	93
4.2.5	Zusammenfassung sekundäres Screening.....	98
4.3	Medien- und Prozessoptimierung für <i>B. vallismortis</i> B-14891 mit Glucose als Kohlenstoffquelle	99
4.3.1	Bestimmung des Aminosäure- und Ionenbedarfs.....	99
4.3.2	Substitution von Hefeextrakt	103
4.3.2.1	Organische und anorganische Stickstoffquellen	103
4.3.2.2	Zusatz von Ammoniumsulfat, Aminosäuren und Vitaminen	105
4.3.2.3	Einsatz alternativer Stickstoffquellen	108
4.3.3	Einfluss einer pH-Endwertregelung im Bioreaktor.....	110
4.3.4	Einfluss des Sauerstoffeintrages.....	112

4.3.5	Einfluss des Sauerstoffgehaltes bei hohen Glucosekonzentrationen	116
4.3.6	Referenzkultivierung.....	119
4.3.7	Maximale initiale Glucosekonzentration.....	121
4.3.8	Fed-Batch-Kultivierung	122
4.4	Medien- und Prozessoptimierung für <i>B. vallismortis</i> B-14891 mit Xylose als Kohlenstoffquelle	131
4.4.1	Einfluss einer pH-Endwertregelung im Bioreaktor	131
4.4.2	Einfluss der Sauerstoffversorgung.....	133
4.4.3	Maximale initiale Xylosekonzentration	134
4.4.4	Referenzkultivierung.....	135
4.4.5	Fed-Batch-Kultivierung	136
4.5	Kultivierungen mit einem Hemicellulose-Hydrolysat aus Birkenholz	137
4.5.1	Zuckerkonzentration in den Hydrolysatfraktionen	138
4.5.2	Nebenproduktanalyse der Hydrolysatfraktionen.....	139
4.5.3	Einfluss einzelner Nebenprodukte auf die 2,3-Butandiolproduktion	140
4.5.4	Untersuchung von Kreuzinhibitionen.....	145
4.5.5	Detoxifizierung vom Ultra- und Nanofiltrat	146
4.5.5.1	Detoxifizierung mittels Anionentauscher und Umkehrphase	147
4.5.5.2	Detoxifizierung mittels flüssig-flüssig-Extraktion	148
4.5.6	Batch Kultivierung mit Birkenholz-Hemicellulose-Hydrolysat	150
5	Zusammenfassung	153
6	Ausblick	155
	Abbildungsverzeichnis.....	156
	Tabellenverzeichnis.....	167
	Literatur.....	172
	Anhang	181
	Danksagung	193

Abkürzungsverzeichnis

2,3-BDO	2,3-Butandiol
5-HMF	5-Hydroxymethylfurfural
AC	Acetoin
AS	Aminosäure
BDH	Butandioldehydrogenase
β	Konzentration in g/L
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CTR	Kohlenstoffdioxidtransferrate
g	Gramm
<i>g</i>	Zentrifugalkraft
GC-FID	Gaschromatographie mit Flammenionisationsdetektor
GC-MS	Gaschromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung
Glu	Glucose
h	Stunde
HE	Hefeextrakt
HPAEC-PAD	Ionenaustauschchromatographie mit gekoppelter amperometrischer Detektion (<i>engl.</i> <u>H</u> igh <u>P</u> erformance <u>A</u> nion <u>E</u> xchange <u>C</u> hromatography - <u>P</u> ulsed <u>A</u> mpere <u>m</u> etric <u>D</u> etection)
HPLC	Hochdruckflüssigkeitschromatographie (<i>engl.</i> <u>H</u> igh <u>P</u> ressure <u>L</u> iquid <u>C</u> hromatography)
IC	Ionenchromatographie
ICP-OES	Optische Emissionsspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma (<i>engl.</i> <u>I</u> nductively <u>C</u> oupled <u>P</u> lasma- <u>O</u> ptical <u>E</u> mission <u>S</u> pectrometry)
kg	Kilogramm
L	Liter
max	Maximal
MEK	Methylethylketon
MES	Morpholinoethansulfonsäure
min	Minute
MTBE	Methyl-tert-Butylether
MTP	Mikrotiterplatte
n.d.	Nicht detektiert
NF	Nanofiltrat

Abkürzungsverzeichnis

O ₂	Sauerstoff
OD	Optische Dichte
OTR	Sauerstofftransferrate
P	Produktivität in g/(L·h)
PMP	Polymethylpenten
PPP	Pentosephosphat-Stoffwechselweg
PTFE	Polytetrafluorethylen
Rapsschrot	Rapsextraktionsschrot
RI	Brechungsindex (<i>engl.</i> <u>R</u> efractive <u>I</u> ndex)
RIU	Brechungsindex Unit
RP	Umkehrphase (<i>engl.</i> <u>R</u> eversed <u>P</u> hase)
rpm	Drehungen pro Minute (<i>engl.</i> <u>R</u> ounds <u>P</u> er <u>M</u> inute)
RQ	Respirationsquotient
RT	Raumtemperatur
SSF	Simultane Verzuckerung und Fermentation (<i>engl.</i> <u>S</u> imultaneous <u>S</u> accharification and <u>F</u> ermentation)
SIM	Einzelionen Aufnahme (<i>engl.</i> <u>S</u> ingle <u>I</u> on <u>M</u> onitoring)
Synth.	Synthetisch
TCA	Citratzyklus (<i>engl.</i> <u>T</u> ricarboxylic <u>A</u> cid)
TDS	Totaler Gelösfeststoffanteil (<i>engl.</i> <u>T</u> otal <u>D</u> issolved <u>S</u> olids)
UF	Ultrafiltrat
UV	Ultraviolett
VIS	Sichtbares Licht (<i>engl.</i> <u>V</u> isible)
Vit	Vitamin
X	Umsatz in %
Y	Ausbeute in g/g

1 Einleitung und Zielsetzung

Weltweit steigt der Bedarf an Energie und Rohstoffen (Yong et al. 2016). Dies liegt vor allem an der wachsenden Weltbevölkerung und den steigenden Lebensstandards (Capellán-Pérez et al. 2015). Viele unserer Alltagsgegenstände und -verbrauchsmaterialien wie Plastik, Farben, Reinigungsmittel und Kosmetika werden aus endlichen, fossilen Rohstoffen gefertigt. Durch die Endlichkeit der fossilen Ressourcen und den voranschreitenden Klimawandel müssen andere Wege gefunden werden, um Alltagsprodukte herzustellen. Die Herausforderung ist dabei, nachhaltige und CO₂- bzw. klimaneutrale Technologien und Prozesse zu entwickeln (Sheldon 2014). Nachwachsende Rohstoffe sowie Reststoffe aus der Forst- und Agrarwirtschaft stellen potentielle, alternative Rohstoffquellen dar. Mittels chemischer oder biotechnischer Konversionsprozesse können die alternativen Rohstoffe zu industriell nutzbaren Chemikalien umgesetzt werden.

Ein vielversprechender biotechnischer Prozess ist die Produktion von 2,3-Butandiol (2,3-BDO), welches als Ausgangsstoff für wichtige Chemikalien wie Butadien oder Methylethylketon genutzt werden kann. Die biotechnologische Herstellung von 2,3-BDO ist bereits seit dem 19. Jahrhundert bekannt. Es gibt biotechnische Prozesse, in denen hohe Endkonzentrationen, Ausbeuten und Produktivitäten erreicht werden. In diesen Verfahren werden meist Risikoklasse-2-Mikroorganismen (humanpathogen) verwendet (Celinska und Grajek 2009, Ji et al. 2011, Voloch et al. 1985). Um mit Stämmen der Risikoklasse 1 (nicht humanpathogen) ähnlich hohe Endkonzentrationen und Ausbeuten zu erreichen, werden teure Substrate wie reine Glucose und teure Komplexbestandteile wie z.B. Hefeextrakt verwendet (Häßler et al. 2012, Jurchescu et al. 2013). Es wird vermehrt nach kostengünstigen Substraten gesucht, die nicht wie Glucose in Konkurrenz mit der Lebensmittel- und Futtermittelindustrie stehen (Fujimoto et al. 2011, Marwoto et al. 2002; Marwoto et al. 2004, Yang et al. 2013). Ein vielversprechendes Substrat ist Xylose, welche aus Holzemicellulosen gewonnen werden kann. Bisher gibt es nur wenige Studien, in denen Xylose für die biotechnische 2,3-BDO-Produktion verwendet wird. Bisher erreichte Endkonzentrationen und Ausbeuten mit Xylose als Substrat sind dabei deutlich geringer als mit reiner Glucose.

Ziel dieser Arbeit ist die Entwicklung eines effizienten biotechnischen Prozesses zur Produktion von 2,3-BDO mit einem Risikoklasse-1-Mikroorganismus. Als Substrat für die Fermentation wird der vielversprechende Rohstoff Hemicellulose betrachtet. Zur weiteren Senkung der Prozesskosten soll ebenfalls die Substitution von teuren Komplexbestandteilen wie Hefeextrakt durch kostengünstige Alternativen betrachtet werden. Verschiedene Screeningmethoden sollen dazu genutzt werden, neue unbekannte Risikoklasse-1-Mikroorganismen, die 2,3-BDO produzieren, zu finden. Dabei ist vorgesehen, potentielle 2,3-BDO-Produzenten im Anschluss an das Screening zu charakterisieren. Der Fokus wird auf die Nährstoffansprüche und die Breite der Substratspektren der Mikroorganismen gelegt.

Einleitung und Zielsetzung

Zusätzlich sollen Hemmstofftests mit Nebenprodukten, die in Holz-Hydrolysaten vorkommen können, durchgeführt werden. Mit Stämmen, die einen geringen Anspruch an ihr Medium stellen und hohe Resistenzen gegenüber Holz-Hydrolysatnebenprodukten aufweisen, soll eine Medien- und Prozessoptimierung erfolgen.

2 Theoretische Grundlagen

2.1 2,3-Butandiol

2,3-Butandiol ist ein farb- und geruchsloser zweiwertiger Alkohol. Es ist hygroskopisch und weist eine gute Wasserlöslichkeit auf. 2,3-BDO hat die Summenformel $C_4H_{10}O_2$ mit einem Molekulargewicht von 90,121 g/mol.

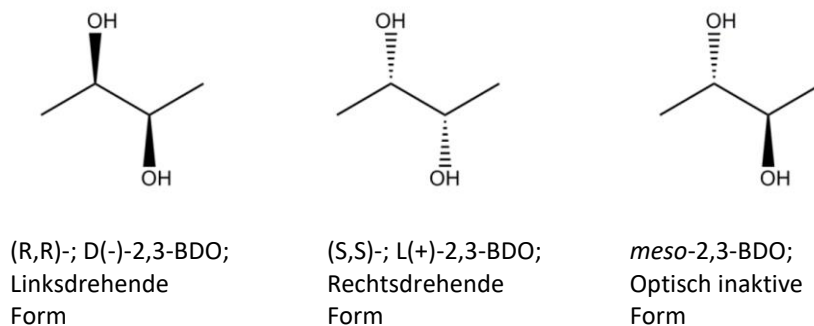


Abbildung 2.1: Stereoisomere von 2,3-BDO (nach Celinska und Grajek 2009 und Ji et al. 2011).

Aufgrund der zwei chiralen Zentren kann 2,3-BDO in drei stereoisomeren Formen vorkommen. Die optisch aktiven rechts- und linksdrehende Form und die optisch inaktive *meso*-Form (Abbildung 2.1). Biotechnisch können alle drei Stereoisomere produziert werden. Welches Isomer gebildet wird, ist dabei abhängig von dem verwendeten Mikroorganismus und den Kultivierungsparametern (Maddox 1996).

Es gibt vielfältige Anwendungsmöglichkeiten für 2,3-BDO. Die wichtigste Eigenschaft von 2,3-BDO ist die Verwendung der Substanz als Ausgangsmaterial für zahlreiche chemische Substanzen (Białkowska 2016). Durch die Dehydration von 2,3-BDO kann 1,3-Butadien gebildet werden, ein Intermediat zu Herstellung von synthetischem Gummi (Celinska und Grajek 2009, Liu et al. 2016). Dabei kann jedes der drei Stereoisomere oder ein Gemisch als Ausgangsstoff eingesetzt werden (Villet 1981). Während des Zweiten Weltkriegs wurden in Canada und den USA, durch die Knappheit von fossilen Rohstoffen, bereits biotechnische Pilotanlagen zur Produktion von 2,3-BDO mit anschließender Konversion zu 1,3-Butadien betrieben. Nach Ende des Zweiten Weltkriegs wurden die Anlagen geschlossen und synthetisches Gummi wieder über den Weg der fossilen Rohstoffe produziert (Singh und Mishra 1995).

2,3-BDO kann ebenfalls durch eine Dehydration zu Methylethylketon (MEK) umgesetzt werden (Emerson et al. 1982, Tran und Chambers 1987). MEK hat einen breiten Anwendungsbereich als Lösemittel zur Herstellung von Harzen und Lacken. Des Weiteren kann MEK zu Oktan-Isomeren umgewandelt werden.

Diacetyl kann durch eine Dehydrierung von 2,3-BDO hergestellt werden. Dabei können alle drei Stereoisomere genutzt werden (Voloch et al. 1985). Diacetyl ist ein Geschmacksstoff, der in Lebensmitteln für einen buttrigen Geschmack sorgt. Auch Acetoin ist ein Lebensmittelzusatzstoff, der direkt biotechnisch oder aus 2,3-BDO hergestellt werden kann. Beide Substanzen sind wichtige Zusatzstoffe für die Lebensmittelindustrie (Nadal et al. 2009).

Weitere Anwendungsbereiche von 2,3-BDO können die Herstellung von Polyurethanschäumen, Frostschutzmitteln, Fungiziden, Tinte, Parfüm oder Trägerstoff von Arzneimitteln sein. Stereoisomer reines 2,3-BDO eignet sich als Komponente für die Polymerherstellung (Garg und Jain 1995, Ji et al. 2011, Syu 2001).

2.1.1 Mikroorganismen

Viele Bakterien sind in der Lage, 2,3-BDO zu bilden. Auch einige Hefen und Algen können 2,3-BDO produzieren. Für die biotechnische Produktion eignen sich diese Organismen aufgrund geringer Ausbeuten und Endtiter jedoch nicht (Celinska und Grajek 2009, Garg und Jain 1995).

Zu den besten 2,3-BDO-Produzenten zählen *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Enterobacter aerogenes* und *Serratia marcescens* (Celinska und Grajek 2009, Ji et al. 2011, Voloch et al. 1985). Mit diesen Stämmen wurden hohe 2,3-BDO-Titer von bis zu 150 g/L erzielt (Afschar et al. 1991, Ji et al. 2010, Ma et al. 2009, Zeng et al. 1991, Zhang et al. 2010). Diese Stämme gehören jedoch zur Risikogruppe 2, sind damit pathogen für den Menschen und erfordern hohe Sicherheitsmaßnahmen.

In den letzten Jahren wurden daher verstärkt Studien mit Mikroorganismen der Risikoklasse 1 durchgeführt (Li et al. 2013b; Metsoviti et al. 2012; Yang et al. 2011). Zu den guten 2,3-BDO-Produzenten der Risikoklasse 1 gehören die Stämme *Bacillus licheniformis*, *Paenibacillus polymyxa* und *Bacillus amyloliquefaciens* (Häßler et al. 2012; Jurchescu et al. 2013; Li et al. 2013b, Li et al. 2014; Yang et al. 2011). Mit dem Stamm *B. licheniformis* DSM 8785 konnte in einem Fed-Batch-Ansatz ein Endtiter von 144,7 g/L 2,3-BDO erreicht werden. Dies ist die höchste Konzentration, die bislang mit einem Risikoklasse-1-Mikroorganismus produziert wurde.

2.1.2 Stoffwechsel der gemischten Säuregärung

2,3-Butandiol wird mikrobiell über den Weg der gemischten Säuregärung produziert. Bakterien, die eine gemischte Säuregärung durchführen, gehören zu den fakultativ anaeroben Enterobacteriaceae oder den fakultativ anaeroben *Bacillus*-Arten. Wie der Name impliziert, entsteht bei der gemischten Säuregärung eine Mischung von verschiedenen Gärungsprodukten. Typischerweise entstehen organische Säuren wie Ameisensäure, Essigsäure, Bernsteinsäure und Milchsäure, Alkohole wie Ethanol und 2,3-Butandiol, sowie Gase wie H_2 und CO_2 . Die Zusammensetzung der Gärungsprodukte ist speziesspezifisch und

zusätzlich abhängig von den gegebenen Umweltbedingungen. Anhand der Gärungsprodukte lassen sich die Bakterien zwei Gärungstypen zuordnen: dem *Escherichia*-Typ und dem *Enterobacter*-Typ. Der *Escherichia*-Typ produziert typischerweise große Mengen an organischen Säuren, wobei in der Regel kein 2,3-BDO gebildet wird. Der *Enterobacter*-Typ hingegen produziert große Mengen an Acetoin und 2,3-BDO und nur geringe Mengen an organischen Säuren (Fuchs und Schlegel 2006). Die Gärung des *Enterobacter*-Typ wird daher auch Butandiolgärung genannt. Neben 2,3-BDO und Acetoin können noch weitere Produkte wie Acetat, CO_2 , Ethanol, Formiat, Lactat, Succinat sowie Biomasse entstehen (Abbildung 2.2).

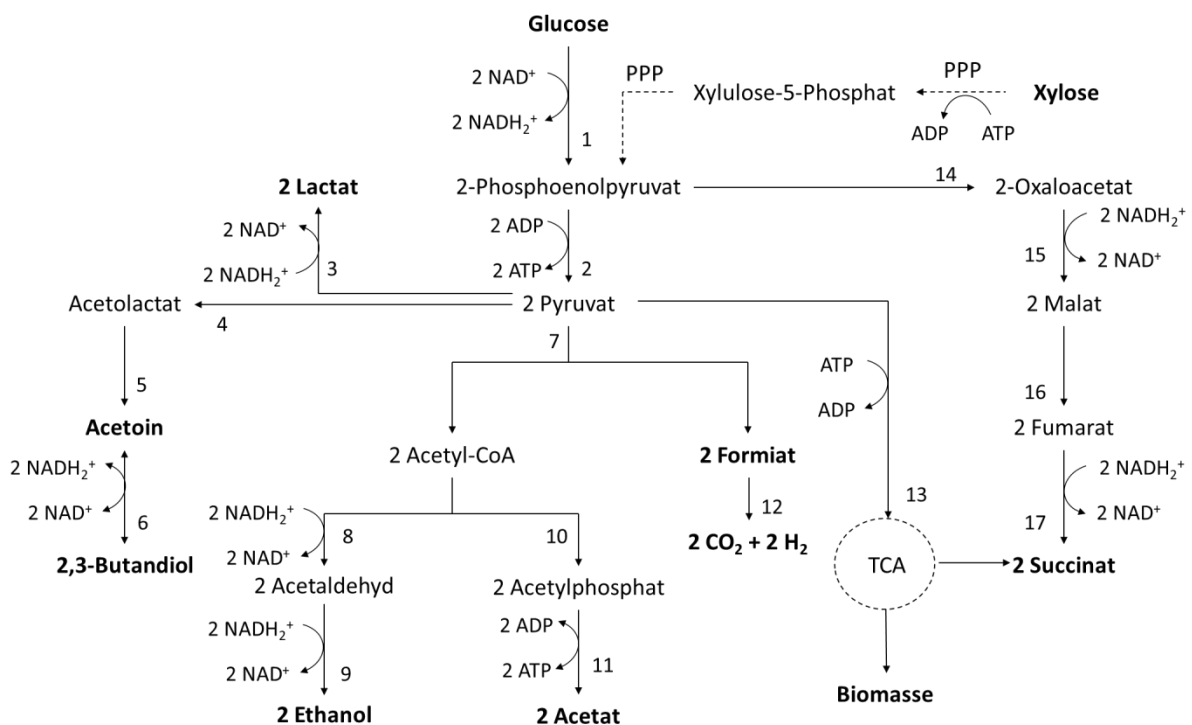


Abbildung 2.2: Stoffwechselwege der gemischten Säuregärung. (1) Enzyme der Glykolyse, (PPP) Pentosephosphatweg, (2) Pyruvat-Kinase, (3) Lactat-Dehydrogenase, (4) Acetolactat-Synthase, (5) Acetolactat-Decarboxylase, (6) Butandiol-Dehydrogenase/Acetoin Reductase, (7) Pyruvat-Formiat-Lyase, (8) Acetaldehyd-Dehydrogenase, (9) Alkohol-Dehydrogenase, (10) Phosphotransacetylase, (11) Acetat-Kinase, (12) Formiat-Hydrogen-Lyase, (13) Enzyme des Citronensäurecyclus (TCA), (14) Phosphoenolpyruvat Carboxylase, (15) Malat-Dehydrogenase, (16) Fumarase, (17) Succinat-Dehydrogenase. Abgeändert nach Bosma et al. 2013 und Converti et al. 2003.

Bei der Butandiolgärung werden Hexosen zunächst über die Glykolyse zu Pyruvat abgebaut. Pentosen hingegen werden über den Pentosephosphat-Stoffwechselweg zu Glycerinaldehyd-3-Phosphat abgebaut, welches wiederum weiter zu Pyruvat über den Weg der Glykolyse verstoffwechselt wird. Die Bildung von 2,3-BDO aus Pyruvat erfolgt über drei enzymatische Schritte. Im ersten Schritt findet eine Kondensation von zwei Pyruvat-Molekülen unter der Abspaltung von CO_2 mithilfe einer Acetolactat-Synthase statt. Das Produkt dieser Reaktion ist das instabile Acetolactat, welches durch eine Decarboxylierung

durch das Enzym Acetolactat-Decarboxylase zu Acetoin umgewandelt wird oder durch eine nicht-enzymatische Reaktion zu Diacetyl decarboxyliert wird. Die nicht-enzymatische Reaktion spielt dabei eine geringfügige Rolle und gebildetes Diacetyl kann durch die Butandiol-Dehydrogenase (BDH) ebenfalls in Acetoin überführt werden. Der letzte Schritt, die Umwandlung von Acetoin zu 2,3-BDO, wird durch die BDH katalysiert (Blomqvist et al. 1993, Maddox 1996, Xiao und Xu 2007). Die Überführung von Acetoin zu 2,3-BDO ist reversibel, wohingegen die ersten zwei Schritte der Reaktionskette irreversibel sind (Abbildung 2.2 und Abbildung 2.3).

2.1.3 Physiologischer Nutzen

Bakterien, die eine gemischte Säurefermentation durchführen, sind fakultativ anaerob. Sie können benötigte Energie über eine aerobe Atmung oder über eine anaerobe Fermentation beziehen. Die Bildung der unterschiedlichen Produkte dient dem Organismus zur Erhaltung eines bestimmten $\text{NAD}^+/\text{NADH}_2^+$ -Gleichgewichtes bei unterschiedlichen Kultivierungsbedingungen (Converti et al. 2003, Li et al. 2013a).

2,3-BDO ist ein Produkt des sauerstofflimitierten Wachstums. Die Haupteinflussparameter bei der 2,3-BDO-Produktion sind somit die Sauerstoffzufuhr und der Gelöstsauerstoff während einer Kultivierung. In der Glykolyse wird bei der Umwandlung von Glycerinaldehyd-3-Phosphat zu Pyruvat NAD^+ zu NADH_2^+ reduziert. Unter aeroben Bedingungen wird NAD^+ über die Respiration zurück gewonnen, wohingegen bei sauerstofflimitierenden Bedingungen dieser Weg der Rückgewinnung nicht zur Verfügung steht. Bei der Reduzierung von Acetoin zu 2,3-BDO wird ebenfalls NADH_2^+ zu NAD^+ oxidiert, welches dann der Glykolyse wieder zur Verfügung gestellt wird. Da die Reaktion zwischen Acetoin und 2,3-BDO reversibel ist und bei der Umsetzung von 2,3-BDO zu Acetoin wiederum NADH_2^+ entsteht, wird der 2,3-BDO-Stoffwechselweg der Erhaltung des $\text{NAD}^+/\text{NADH}_2^+$ -Gleichgewichts in den Zellen bei einer Änderung von Kultivierungsbedingungen zugeschrieben (Blomqvist et al. 1993, Maddox 1996, Xiao und Xu 2007). Zudem kann der 2,3-BDO-Stoffwechselweg als Strategie zur Energie- und Kohlenstoffspeicherung angesehen werden. Liegt Glucose im Medium im Überfluss vor und somit ein reduzierendes Milieu, wird vorwiegend 2,3-BDO produziert. Sinkt der Glucoseanteil unter einen kritischen Wert oder ist verbraucht, wird angereichertes 2,3-BDO metabolisiert und das Hauptprodukt ist Acetoin. Dabei wird NADH_2^+ gebildet, welches für die Erhaltung zellulärer Funktionen benötigt wird (Magee und Kosaric 1987, Li et al. 2013a, Xiao et al. 2012).

Ein weiterer physiologischer Nutzen für den Organismus ist die Umstellung des Metabolismus von der Produktion organischer Säuren (Acidogenese) zur Produktion von neutralen Komponenten (Solventogenese). Durch diese Umstellung wird einer Versäuerung des Mediums entgegengewirkt (Białkowska 2016, Li et al. 2013a, Xiao und Xu 2007).

Die genauen Mechanismen zur Regulierung der einzelnen Produkte sind noch nicht vollends geklärt. Acetat wird gebildet, wenn der Energiebedarf der Zelle hoch ist und sauerstoff-

reduzierte Umgebungsbedingungen vorherrschen. Die Bildung von Acetat ist aus energetischer Sicht für den Organismus vorteilhafter als die Bildung von Lactat. Die Bildung von Acetat geht dabei immer mit der Bildung von 2,3-BDO oder Ethanol einher, um das Redoxgleichgewicht aufrecht zu erhalten (Maddox 1996). Bei einem geringen Sauerstoffbedarf der Zelle, wie beispielsweise bei geringen Wachstumsraten, ist 2,3-BDO das favorisierte Produkt.

Es wird zudem angenommen, dass die Umstellung der Stoffwechselwege durch die Akkumulation von den verschiedenen Metaboliten verursacht wird. Es konnte festgestellt werden, dass einige Stoffwechselwege durch die Akkumulation von Produkten anderer Stoffwechselwege inhibiert werden. Akkumuliertes Ethanol wurde beispielsweise als Inhibitor für die spezifische Wachstumsrate und für die Lactat-Dehydrogenase ausgemacht (Converti und Perego 2002). Acetat hingegen gilt als Aktivator für den 2,3-BDO-Stoffwechselweg.

2.1.4 Einfluss des pH-Wertes auf die 2,3-Butandiol-Produktion

Der pH-Wert hat einen großen Einfluss auf die Regulation des bakteriellen Metabolismus, besonders bei Bakterien mit einer Vielzahl an Endprodukten. Ganz allgemein kann gesagt werden, dass Bakterien mit einer gemischten Säurefermentation unter alkalischen Bedingungen saure Fermentationsprodukte produzieren und in einem sauren Milieu neutrale Produkte (Booth 1985, Magee und Kosaric 1987). Mickelson und Werkman zeigten 1938, dass sich im alkalischen Bereich durch die verstärkte organische Säurebildung die 2,3-BDO-Ausbeute vermindert, wohingegen im sauren Bereich die Produktion von organischen Säuren um ein zehnfaches sinkt und die 2,3-Butandiol-Produktion um den Faktor 3,7 steigt (Garg und Jain 1995, Magee und Kosaric 1987, Mickelson und Werkman 1938).

Durch die Bildung von organischen Säuren kommt es im Kultivierungsverlauf zu einer Versäuerung des Mediums. Dabei wirken besonders die undissoziierten Formen der Säuren toxisch auf die Mikroorganismen (Zeng et al. 1990b). Mit sinkendem pH-Wert nimmt die Toxizität der Fermentationsprodukte zu, wodurch das Wachstum und der Substratumsatz sukzessive sinken. Die Umstellung des Metabolismus auf den 2,3-BDO-Stoffwechselweg dient der Entgegenwirkung einer Versäuerung. Dabei ist nicht allein der pH-Wert ausschlaggebend für die Umstellung des Metabolismus. Durch die Bildung saurer Produkte sinkt der pH-Wert im Medium. Durch einen niedrigen äußeren pH-Wert steigt wiederum der transmembrane pH-Gradient, wodurch sich die gebildeten Säuren im Cytoplasma anreichern. Die Säuren bzw. ihre Salze induzieren ab einem gewissen Schwellenwert die Enzyme des 2,3-BDO-Stoffwechselweges, bevor die äußere Säurekonzentration das Wachstum inhibieren kann (Booth 1985, Maddox 1996). Acetat bzw. Essigsäure spielt bei diesem Mechanismus eine entscheidende Rolle und dient sowohl als Induktor als auch als Inhibitor für den 2,3-BDO-Stoffwechselweg (Abbildung 2.3).

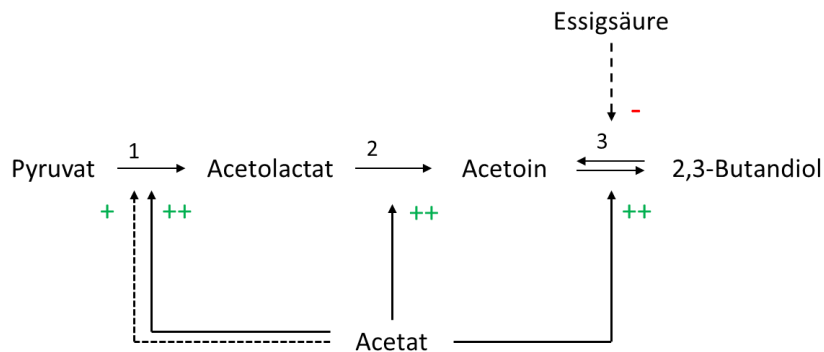


Abbildung 2.3: Aktivierung, Induktion und Inhibition der Enzyme des 2,3-BDO-Stoffwechselwegs. (1) Acetolactat-Synthase; (2) Acetolactat-Decarboxylase; (3) Butandiol-Dehydrogenase/Acetoin Reductase. Durchgezogener Pfeil ++: Induktion des Enzyms; fein gestrichelter Pfeil +: Aktivierung des Enzyms; gestrichelter Pfeil -: Inhibition. Abbildung geändert nach Maddox 1996.

Wird Xylose als einzige Kohlenstoffquelle eingesetzt, sinkt der pH-Wert mehr als mit Glucose (Marwoto et al. 2004). Marwoto et al. 2004 zeigte, dass die höhere Acetatproduktion durch eine höhere Acetat-Kinase Aktivität sowie einer geringeren Acetataufnahmerate verursacht wird.

Studien mit einem geregelten, konstanten pH-Wert zeigen, dass ein leicht saurer pH-Wert die 2,3-BDO-Produktion fördert. Ein pH-Wert zwischen 5,0 und 6,0 wird in der Literatur häufig als optimal für die 2,3-BDO-Produktion genannt (Grover et al. 1990, Jansen et al. 1984, Perego et al. 2000, Raspoet et al. 1991, Voloch et al. 1985, Wong et al. 2014). Einige Studien berichten auch von höheren pH-Werten als Optimum für die 2,3-BDO-Produktion. Für *P. polymyxa* wurde von einem pH-Wert zwischen 6,3 und 6,8 zur Produktion von optisch reinem D-2,3-Butandiol berichtet (Nakashimada et al. 2000). Für einen *B. licheniformis*-Stamm wurde ein pH-Wert von 7,0 als Optimum bestimmt (Li et al. 2013b). Förderlich für hohe Ausbeuten ist, wenn der pH-Wert nicht geregelt wird und eine freie Säuerung von einem hohen pH-Wert erfolgt. Ein Start pH-Wert von 7 wird dabei als geeignet beschrieben (Biebl et al. 1998, Celinska und Grajek 2009).

Literaturstudien zum pH-Wert zeigen, dass der optimale pH-Wert stammspezifisch und nicht alleine der pH-Wert ausschlaggebend für eine effiziente Produktion ist. Weitere Parameter wie die Sauerstoff- und Substratverfügbarkeit haben einen entscheidenden Einfluss auf die Produktion und Ausbeute (Biebl et al. 1998). Auch das Substrat selbst spielt eine wichtige Rolle. Es wird davon berichtet, dass für Glucose ein anderer pH-Wert als optimal betrachtet werden kann als für Pentosen (Garg und Jain 1995).

2.1.5 Einfluss des Sauerstoffgehaltes auf die 2,3-Butandiol-Produktion

Der Sauerstoffgehalt während der Fermentation ist der Parameter mit dem größten Einfluss auf die 2,3-BDO-Produktion (Syu 2001, Yen et al. 2014). 2,3-BDO ist ein Produkt des anaeroben Stoffwechselweges, die Produktion lässt sich jedoch maßgeblich durch die Begasung mit Sauerstoff oder Luft steigern. 2,3-BDO-produzierende Bakterien können in An- und Abwesenheit von Sauerstoff wachsen. Die fakultativ anaeroben Bakterien beziehen ihre Energie dabei über die Respiration oder die Fermentation. Unter sauerstofflimitierten Bedingungen sind beide Stoffwechselwege aktiv. Das Wachstum unter aeroben Bedingungen ist effektiver und es wird mehr Biomasse gebildet. Im Zuge einer Sauerstofflimitierung setzt die 2,3-BDO-Produktion ein. Die volumetrische 2,3-BDO-Produktivität steht dabei in direktem Zusammenhang mit der Menge an Biomasse im Kultivierungsmedium (Maddox 1996). Hingegen hat die Wachstumsrate keinen Einfluss auf die Produktbildung und auch bei geringen Wachstumsraten kann eine hohe spezifische Produktbildung stattfinden (Ji et al. 2011, Zeng et al. 1990a).

Der Anteil an verfügbarem Sauerstoff hat zudem einen Einfluss auf das Verhältnis der gebildeten Produkte der gemischten Säurefermentation. Die Produktverteilung von dem Risikoklasse-1-Mikroorganismus *P. polymyxa* bei unterschiedlicher Sauerstoffverfügbarkeit im Kultivierungsmedium wurde von De Mas et al. 1988 untersucht und dargestellt (Abbildung 2.4). Bei sehr niedrigen Sauerstoffkonzentrationen wird überwiegend Lactat, Ethanol und 2,3-BDO gebildet. Mit zunehmender relativer Sauerstoffverfügbarkeit nimmt die Produktion von Lactat und Ethanol ab, wohingegen die Produktion von 2,3-BDO zunimmt. Die 2,3-BDO-Produktion erreicht ein Maximum bei einer relativen Sauerstoffverfügbarkeit zwischen 0,2 und 0,4. Mit zunehmender Sauerstoffverfügbarkeit sinkt die 2,3-BDO-Produktion und Acetoin und Acetat werden als Hauptprodukt gebildet. Die Produktverteilung in Abhängigkeit der Sauerstoffkonzentration ist jedoch stammspezifisch. So bildet der Risikoklasse-2-Stamm *Enterobacter aerogenes* im Anaeroben zusätzlich Succinat. Im Aeroben werden 59,4 % des verbrauchten Kohlenstoffs für die Bildung von Biomasse genutzt, Acetat wird nur zu geringen Teilen gebildet (Converti et al. 2003).

Die Bildung der unterschiedlichen Produkte dienen den Organismen zur Erhaltung eines bestimmten $\text{NAD}^+/\text{NADH}_2^+$ -Gleichgewichts unter anaeroben und sauerstofflimitierten Bedingungen (Converti et al. 2003, Li et al. 2013a). Die Zellen regulieren sich in Abhängigkeit der Sauerstoffverfügbarkeit selbst, sodass jeweils die höchstmögliche Ausbeute an ATP erzeugt wird (De Mas 1988). Beispielsweise wird unter aeroben Bedingungen das erste Enzym zur Bildung von 2,3-BDO, die α -Acetolactat-Synthase, inhibiert (Häßler et al. 2012). Die Gene, die den 2,3-BDO-Stoffwechselweg und die Bildung der beteiligten Enzyme (Acetolactat-Decarboxylase, Acetolactat-Synthase und BDH/Acetoin-Reductase) kodieren, sind alle in einem Operon lokalisiert. Dieser Operon wird auf transkriptionaler Ebene durch sauerstofflimitierte Bedingungen induziert (Blomqvist et al. 1993).

Allgemein kann zusammengefasst werden, dass unter anaeroben Bedingungen Ethanol gebildet wird, wodurch der 2,3-BDO-Anteil sinkt. Mit Sauerstoffüberschuss ist der TCA-Zyklus

aktiv und konkurriert mit dem 2,3-BDO-Stoffwechselweg um gebildetes Pyruvat, wodurch der 2,3-BDO-Anteil verringert wird. Für eine effiziente 2,3-BDO-Produktion sollte die Sauerstoffverfügbarkeit zwischen anaeroben Bedingungen und einem Sauerstoffüberfluss, im mikroaeroben Bereich, liegen (Zeng et al. 1994). Wird dem Prozess nur wenig Sauerstoff zugefügt, wird der 2,3-BDO Stoffwechselweg der wichtigste Alternativweg zum TCA-Zyklus. Denn durch die Bildung von 2,3-BDO wird am effektivsten Pyruvat und überschüssiges NADH_2^+ verbraucht (Converti et al. 2003).

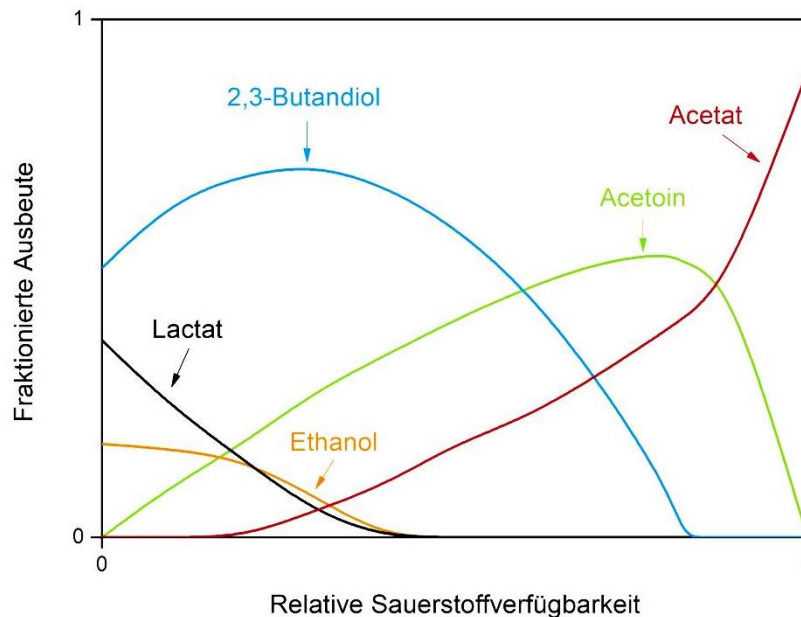


Abbildung 2.4: Einfluss der relativen Sauerstoffverfügbarkeit auf die fraktionierte Ausbeute der Produkte der gemischten Säurefermentation (ungefähre Darstellung nach De Mas et al. 1988 und Maddox 1996).

2.1.6 Kohlenstoffquelle

In einem biotechnischen Prozess zur Herstellung von 2,3-BDO entsteht ein Großteil der Kosten durch die Kohlenstoffquelle. Für einen effizienten industriellen Prozess ist es daher wichtig, diese Kosten zu minimieren und günstige Kohlenstoffquellen zu verwenden (Białkowska 2016, Koutinas et al. 2016). Die Verwertung industrieller Reststoffe ist hierbei ein vielversprechender Ansatz. Interessante biogene Kohlenstoffquellen sind z.B. Zuckerrüben und Zuckerrohr oder Reststoffe aus der Agrarwirtschaft (Willke und Vorlop 2004).

In der Literatur gibt es viele Studien zur Nutzung verschiedener kostengünstiger Substrate wie Xylose (Marwoto et al. 2002, Marwoto et al. 2004), Xylan, Getreidefasern (Hespell 1996), Stärke-Hydrolysat (Perego et al. 2003), Hirse-Hydrolysat (Guragain et al. 2017) Inulin (Li et al. 2014) und Rohglycerin (Yang et al. 2013). Jedoch konnte mit keinem dieser Substrate so hohe 2,3-BDO-Konzentrationen erreicht werden, wie mit reiner Glucose oder Saccharose als Kohlenstoffquelle (Häßler et al. 2012, Jurchescu et al. 2013, Yang et al. 2011). Ein Nachteil

von Glucose und Saccharose ist neben den hohen Kosten der Reinsubstrate, dass beide Substrate in Konkurrenz zur Lebensmittel- und Futtermittelindustrie stehen.

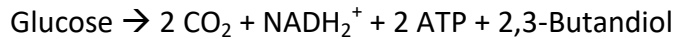
Lignocellulose wird als vielversprechendes, kostengünstiges Substrat betrachtet. In Form von Biomasse steht es ausreichend zur Verfügung und gilt als nachwachsende Ressource. Die Hemicellulosefraktion aus Holz ist überwiegend ungenutzt und steht nicht in Konkurrenz zur Lebensmittel- und Futtermittelindustrie. Viele *Bacillus* Spezies sind in der Lage, verschiedene Polysaccharide aus Pflanzenbiomasse abzubauen und die entstehenden Oligo-, Di- und Monosaccharide zu verwerten. *B. subtilis* ist ein häufig verwendeter Modellorganismus für grampositive Bakterien, der in der Lage ist, 2,3-BDO zu produzieren. Dieser Organismus kann mindestens 18 verschiedene Mono- oder Disaccharide als alleinige Kohlenstoffquelle verwerten (Stülke und Hillen 2000). Die Pentose Xylose konnte von dem Stamm *B. subtilis* 168 nicht verwertet werden, wenn diese als alleinige Kohlenstoffquelle vorliegt. Xylan hingegen konnte durch den Stamm verwertet werden. Hierfür sekretiert der Stamm Enzyme wie β -Fructanase, β -Xylanase, α -Arabinase und β -Mannanase, die das Xylan abbauen. Die Gene die diese Enzyme codieren sind mit Genen geclustert, die Enzyme für den Katabolismus der entstehenden Kohlenstoffquellen codieren (Lindner et al. 1994, Stülke und Hecker 1994, Stülke und Hillen 2000). Stämme des Genus *Bacillus* sind allgemein in der Lage Hemicellulose (Xylan) zu verwerten. Für die Depolymerisierung der komplexen Nährstoffe sekretieren die Mikroorganismen verschiedene Enzyme wie Glucanasen, Proteasen und Nukleasen (Stülke und Hillen 2000).

Um die Zucker in lignocellulosehaltigem Material den Mikroorganismen besser zur Verfügung zu stellen, muss das Material vorbehandelt werden. In der Vorbehandlung werden die Cellulose und Hemicellulose aus dem lignocellulosehaltigem Material gelöst. Hierfür eignet sich verschiedene Methoden, die in die Gruppen physikalische Vorbehandlung, physikalisch-chemische Vorbehandlung und chemische Vorbehandlung unterteilt werden können (Taherzadeh und Karimi 2008). Cellulose und Hemicellulose können nach der Vorbehandlung enzymatisch oder chemisch hydrolysiert bzw. monomerisiert werden. Durch die Hydrolyse sind im Hydrolysat neben den entstehenden Zuckern auch Nebenprodukte enthalten. Einige Nebenprodukte verlängern die lag-Phase und/oder inhibieren das mikrobiologische Wachstum und die 2,3-BDO-Produktion (Frazer und McCaskey 1991; Palmqvist und Hahn-Hägerdal 2000a; Zha et al. 2014).

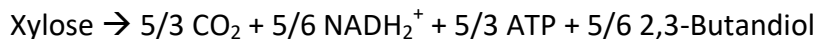
2.1.7 Theoretische Ausbeuten für Hexosen und Pentosen

Die Nettobilanzen für die Bildung von 2,3-BDO aus Glucose und Xylose sind in Gleichung 1 und Gleichung 2 dargestellt:

Gleichung 1: Nettobilanz für die Bildung von 2,3-BDO aus Glucose.



Gleichung 2: Nettobilanz für die Bildung von 2,3-BDO aus Xylose.



Für beide Reaktionen ist die theoretische 2,3-BDO-Ausbeute bezogen auf die Masse 0,5 g/g. Vom Gesamtkohlenstoff der Zucker werden 2/3 für die Bildung von 2,3-BDO genutzt und 1/3 geht als CO₂ verloren. Die maximale theoretische molare Ausbeute von Hexosen beträgt 1,0 mol/mol und von Pentosen 0,83 mol/mol (Maddox 1996).

2.1.8 Einfluss der initialen Substratkonzentration

Die theoretisch maximale Ausbeute von Hexosen und Pentosen liegt bei 0,5 g/g. Der theoretisch maximale 2,3-BDO-Endtiter, der in einem Batch-Ansatz erreicht werden kann, steigt somit proportional mit steigender Substratkonzentration. Durch eine steigende initiale Zuckerkonzentration, steigt häufig auch der Bedarf an weiteren Medienbestandteilen, die in höheren Konzentrationen hemmend wirken können. Sind keine Medienbestandteilen limitierend bzw. liegen keine inhibierenden Substanzen vor, können initiale Substratkonzentrationen bis zu 200 g/L verstoffwechselt werden (Maddox 1996). Tabelle 2.1 zeigt eine Auflistung verschiedener Mikroorganismen und die maximalen initialen Substratkonzentrationen, die diese verwerten können. Hierbei ist ein Unterschied zwischen Glucose und Xylose erkennbar. Es zeigt sich, dass das Substrat selbst einen Einfluss auf die maximale initiale Substratkonzentration hat. *B. licheniformis* und *P. polymyxa* sind in der Lage, höhere Glucose- als Xylosekonzentrationen zu verwerten. *K. oxytoca* ist in der Lage auch bei hohen initialen Xylosekonzentrationen noch 2,3-BDO effizient zu produzieren.

Tabelle 2.1: Maximale initiale Substratkonzentration verschiedener Mikroorganismen.

Mikroorganismus	Substrat	Initiale Konzentration [g/L]	2,3-BDO [g/L]	Ausbeute [g/g]	Quelle
<i>K. pneumoniae</i> NRRL B199	Glucose	195	88,0	0,45	Sablayrolles und Goma 1984
<i>Klebsiella</i> sp. Zmd30	Glucose	146	57,2	0,39	Wong et al. 2014
<i>K. oxytoca</i> ATTC 8724	Xylose	150	49,0	0,33	Jansen et al. 1984
<i>P. polymyxa</i> CICC 10010	Glucose	140	53,0 ¹	0,38	Jiang et al. 2015
<i>P. polymyxa</i> NRC 9031-1	Xylose	40	7,0	0,25	Laube et al. 1984
<i>B. licheniformis</i> DSM 8785	Glucose	180	72,6	0,40	Jurchescu et al. 2013
<i>B. licheniformis</i> CGMCC 5461	Xylose	80	31,2	0,39	Li et al. 2014
<i>B. amylo- liquefaciens</i> ATCC 23350	Glucose	74,8	25,8	0,35	Alam et al. 1990

1: 2,3-BDO + Acetoin

2.2 Lignocellulosehaltige Biomasse

Lignocellulosehaltige Biomasse zählt zum sogenannten 2nd generation feedstock. Im Gegensatz zum 1st generation feedstock konkurriert der 2nd generation feedstock nicht mit der Lebensmittel- oder Futtermittelindustrie. Zum 1st generation feedstock gehören stärke- und zuckerhaltige Pflanzen wie Weizen, Gerste, Mais oder Zuckerrohr. Zum 2nd generation feedstock zählen non-food Rohmaterialien wie Stroh oder Holz sowie verschiedene agrarische Reststoffe oder Reststoffe aus der Holzverarbeitung (González-Gracia 2010, Zha 2014).

Die lignocellulosehaltige Biomasse ist aus drei Hauptbausteinen aufgebaut: Cellulose, Hemicellulose und Lignin (Abbildung 2.5). Stärkehaltige Kohlenhydrate der 1st generation feedstocks können einfach in fermentierbare Zucker überführt werden. Dies ist mit lignocellulosehaltiger Biomasse der 2nd generation feedstocks nicht möglich, da der Kohlenstoff in komplexen und beständigen Verbundstrukturen vorliegt.

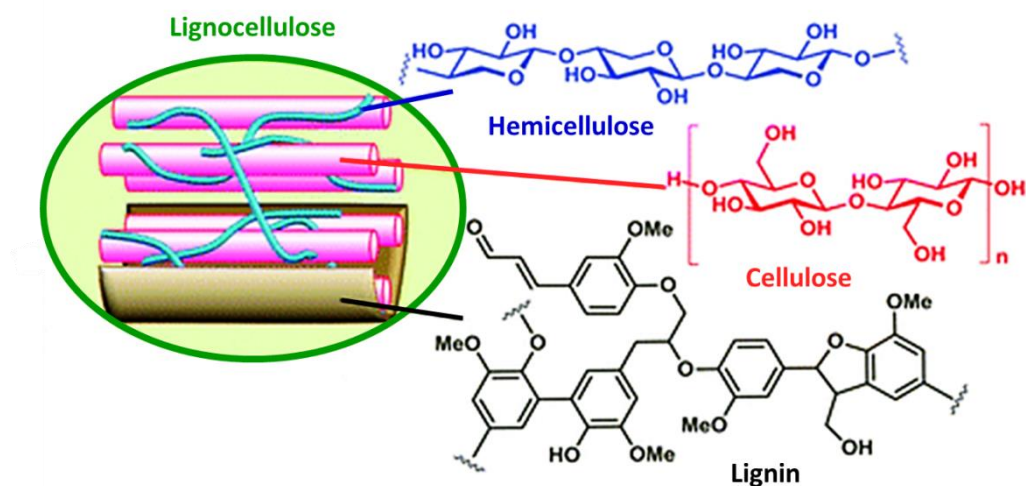


Abbildung 2.5: Schematische Darstellung von Lignocellulose und der Verteilung von Cellulose, Hemicellulose und Lignin. Abbildung geändert nach Kobayashi und Fukuoka 2013.

2.2.1 Cellulose

Cellulose ist das Hauptpolysaccharid in Holz und pflanzlichen Material, mit einem Anteil von 30 - 50 % (Chen 2014, Wikberg und Maunu 2004). Es ist ein lineares Polysaccharid, das aus β -D-Glucose-Einheiten besteht, die über β -1,4-glycosidische Bindungen miteinander verknüpft sind. Die Moleküle sind linear und haben die Neigung intra- und intermolekulare Wasserstoffbrückenbindungen zu bilden, wodurch sich die Cellulosemoleküle zu Mikrofibrillen und diese wiederum zu Fibrillen und Cellulosefasern anordnen (Laine 2005).

2.2.2 Hemicellulose

Hemicellulose ist ein Überbegriff für verzweigte Polymere und weist keine einheitliche Struktur auf. So unterscheiden sich Hemicellulosen verschiedener Pflanzenarten in der monomeren Zusammensetzung, dem Polymerisierungsgrad sowie den Substituenten und den Verzweigungen. Abhängig vom Material kann die Hemicellulose einen Gewichtsanteil von 20-40 % ausmachen (McKendry 2002). Die Heteropolymere werden meist klassifiziert und die Namensgebung ergibt sich aus den Hauptzuckern und/oder -resten. Die Hemicellulose in Nadelhölzern enthält überwiegend Glucomannan und macht etwa 20 % des Trockengewichts aus (Lundqvist et al. 2003). Das Glucomannan ist aus Mannose- und Glucosemonomeren aufgebaut, die wie Cellulose über β -1,4-glycosidische Bindungen miteinander verknüpft sind. Das Verhältnis von Glucose zu Mannose liegt bei etwa 1:3 (Hakkila et al. 1989). Die Hemicellulose aus Laubhölzern hingegen besteht hauptsächlich aus Glucuronoxylan (Abbildung 2.6), die ein Trockengewichtanteil von 15 – 30 % ausmacht (Gírio et al. 2010). Das Rückgrat von Glucuronoxylan besteht aus Xylosemonomeren, die über β -1,4-glycosidische Bindungen miteinander verknüpft sind. An etwa jeder zehnten Xyloseeinheit ist ein Glucuronsäurerest gebunden (Barnett et al. 2003).

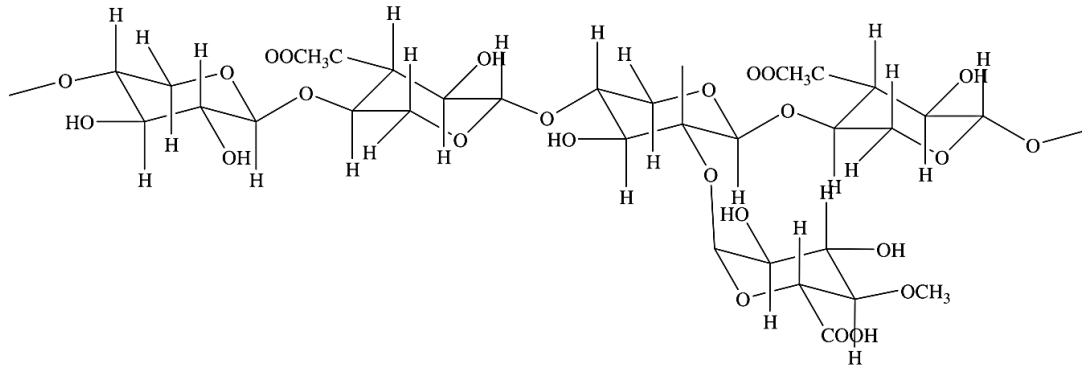


Abbildung 2.6: Partielle Struktur von O-Acetyl-4-Methylglucuronoxylan (Mamman et al. 2008).

Monomere der verschiedenen Hemicellulose sind hauptsächlich D-Xylose, D-Mannose, D-Glucose, D-Arabinose, D-Galactose und D-Galacturonsäure. Es können aber auch weitere Zucker oder Zuckersäuren in geringen Mengen enthalten sein. Um die Zucker für eine biotechnische Anwendung nutzbar zu machen, müssen die Verbundstrukturen der lignocellulosehaltigen Biomasse aufgeschlossen werden.

2.2.3 Lignin

Lignin ist ein Bestandteil aus der Zellwand von Pflanzen. Lignin hat für die Pflanzen mehrere Funktionen. Es erhöht die Druckfestigkeit und bietet der Pflanze Stabilität und es schützt unter anderem vor dem Austrocknen bzw. dem Eindringen von Wasser und bietet Schutz vor Mikroorganismen (Anders 2014). Je nach Spezies macht Lignin einen Anteil von 10 – 25 % des pflanzlichen Materials aus (Yang et al. 2007). Lignin ist ein komplexes, dreidimensionales, zufälliges Polymer aus aliphatischen und aromatischen Bestandteilen (Eichhorn et al. 2001). Lignin hat keine einheitliche Struktur, es gibt keine wiederkehrenden Polymersequenzen oder sich regelmäßig wiederholende Untereinheiten. Um verschiedene Ligninstrukturen zu charakterisieren, wird typischerweise der Gehalt von häufig auftretenden Aromaten bestimmt. Die Ligninstrukturen können so miteinander verglichen werden (Chen und Dixon 2007, Sette et al. 2011).

2.2.4 Nebenprodukte aus lignocellulosehaltiger Biomasse

Um lignocellulosehaltige Biomasse nutzen zu können, muss die Struktur aufgeschlossen und die Zucker zugänglich gemacht werden. Neben verschiedenen Zuckern, enthält ein Hydrolysat durch die Vorbehandlung und den Aufschluss auch verschiedene Nebenprodukte. Die Nebenprodukte können in drei Gruppen eingeteilt werden:

- i) schwache Säuren
- ii) Furanderivate
- iii) phenolische Komponenten

Die Hydrolyse der zuckerhaltigen Lignocellulose erfolgt häufig enzymatisch oder chemisch. Bei der enzymatischen Hydrolyse entstehen keine weiteren Folgereaktionen. Folglich sind weniger hemmende Nebenprodukte im Hydrolysat vorhanden. Für die enzymatische Hydrolyse wird jedoch eine Vorbehandlung benötigt, um die Cellulose und Hemicellulose den Enzymen zugänglich zu machen.

Bei der chemischen Hydrolyse können durch hohe Temperaturen Nebenprodukte der genannten drei Gruppen entstehen. In Abbildung 2.7 sind die Abbaureaktion von Lignocellulose zu Monosacchariden, schwachen Säuren und phenolischen Komponenten schematisch dargestellt. Hemicellulose wird zu Xylose, Mannose, Galactose, Glucose und Essigsäure abgebaut. Bei hohen Temperaturen wird Xylose weiter zu Furfural umgesetzt. 5-HMF entsteht simultan durch den Abbau von Glucose, Mannose und Galactose, die aus der Hemicellulose und/oder Cellulose stammen. Ameisensäure entsteht durch den weiteren Abbau von Furfural und 5-Hydroxymethylfurfural (5-HMF). Lävulinsäure ist ein Abbauprodukt von 5-HMF. Die phenolischen Komponenten entstehen durch einen partiellen Abbau des Lignins (Palmqvist und Hahn-Hägerdahl 2000b).

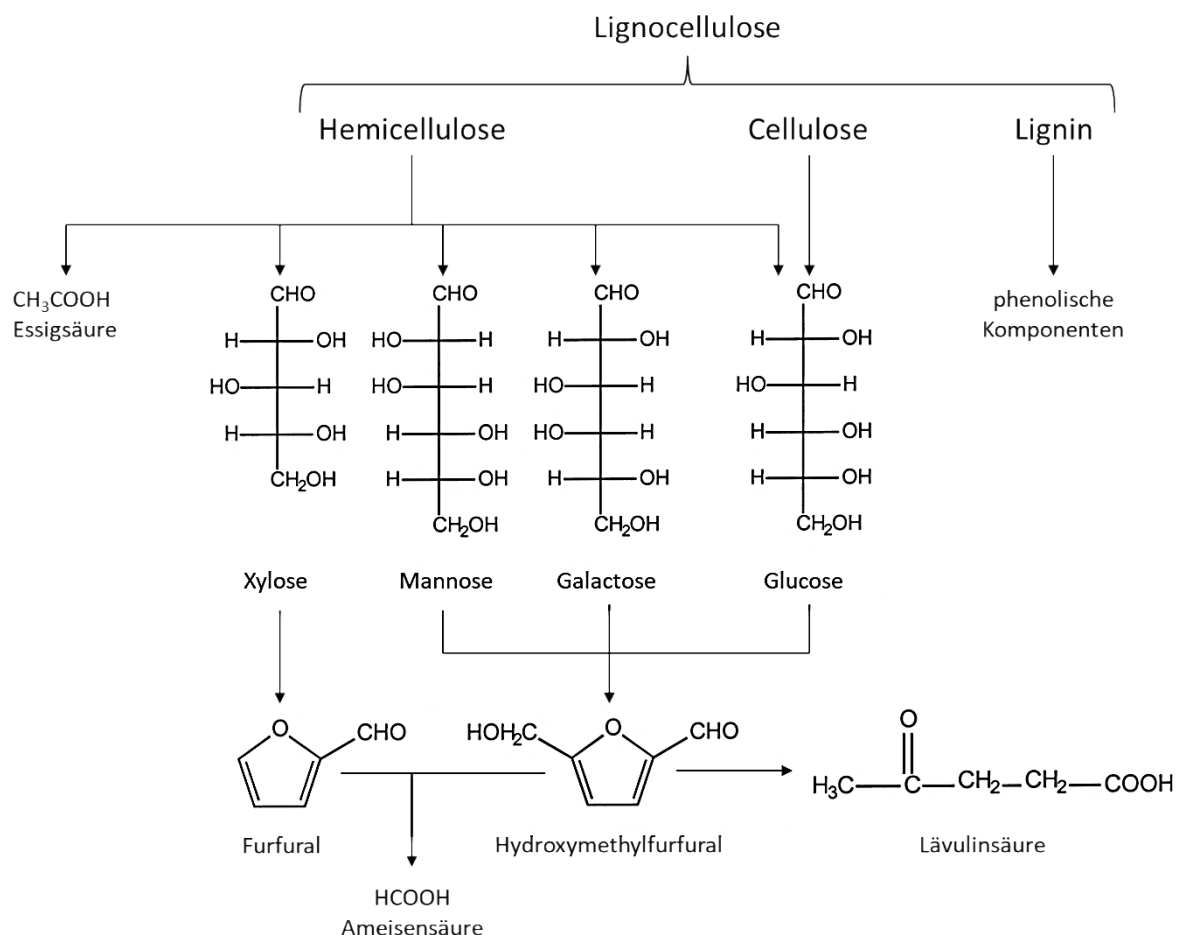


Abbildung 2.7: Reaktionsschema der Hydrolyse von Lignocellulose. Es können Monosaccharide, schwache Säuren, Furanderivate und phenolische Komponenten entstehen (Abbildung geändert nach Palmqvist und Hahn-Hägerdahl 2000b).

Die Nebenprodukte können auf Mikroorganismen inhibierend wirken und beispielsweise die lag-Phase verlängern, die Produktivität verringern und/oder das Wachstum hemmen (Frazer und McCaskey 1991; Palmqvist und Hahn-Hägerdal 2000a; Zha et al. 2014). Hydrolysate unterscheiden sich je nach Einsatzstoff, Vorbehandlungsmethode und Hydrolyse in ihrer Zusammensetzung. Zusätzlich reagieren Mikroorganismen unterschiedlich auf die verschiedenen Inhaltsstoffe eines Hydrolysats. Es kann daher keine Vorhersage darüber getroffen werden, ob ein Hydrolysat von einem Mikroorganismus gut verwertet werden kann oder ob der Prozess durch den Einsatz des Hydrolysats beeinträchtigt wird (Palmqvist und Hahn-Hägerdal 2000a).

Im Folgenden werden die Hemmwirkungen einiger wichtiger Hydrolysatnebenprodukte erläutert:

i) Schwache Säuren

Schwache Säuren hemmen das Wachstum von Mikroorganismen und werden daher auch als Konservierungsmittel in der Lebensmittelindustrie verwendet. Die schwachen Säuren sind im undissoziierten Zustand fettlöslich und können durch die Plasmamembran ins Cytosol dringen. Im Cytoplasma dissoziieren die schwachen Säuren und senken den intrazellulären pH-Wert. Die Zellen müssen die überschüssigen Protonen aus dem Cytoplasma ausschleusen, um der pH-Wert-Senkung entgegen zu wirken. Dieser Prozess verbraucht ATP und die Zelle kann ab einer gewissen Konzentration nicht genug Energie bereitstellen, um die Protonen weiter auszuschleusen (Axe und Bailey 1995, Diez-Gonzalez und Russel 1997, Ricke et al. 2003).

ii) Furfural und 5-HMF

Furfural wird von Hefen während der Alkoholgärung zu Furfurylalkohol reduziert oder zu Furan-2-carbonsäure oxidiert. Furfural und die Abbauprodukte können sich inhibierend auf die Mikroorganismen auswirken. Die genauen Mechanismen zur Inhibierung sind nicht bekannt. Es wird angenommen, dass Furfural mit zellulären Bestandteilen reagiert, die Zellmembran zerstört und den Metabolismus inhibiert. Durch Furfural, Furfurylalkohol und Furan-2-carbonsäure konnte eine Abnahme der spezifischen Wachstumsrate sowie eine volumetrische und spezifische Abnahme der Ethanol-Produktivität bei Hefen beobachtet werden (Palmqvist und Hahn-Hägerdal 2000b).

5-HMF kann ebenfalls von Hefen verstoffwechselt werden. Dabei entsteht 5-Hydroxymethylfurfurylalkohol. Es wird angenommen, dass 5-HMF und Furfural dieselben Mechanismen der Zellhemmung haben (Palmqvist und Hahn-Hägerdal 2000b).

Die Wirkung von Furfural und 5-HMF auf 2,3-BDO produzierende Bakterien ist weitestgehend unbekannt. Frazer und McCaskey 1991 beobachtete eine Abnahme der 2,3-BDO-Ausbeute bei der Zugabe von 0,05 % (w/v) Furfural zum Kultivierungsmedium. *B. licheniformis* CCTCC M 20144298 zeigte eine starke Inhibierung der 2,3-BDO-Produktion ab einer Konzentration von > 4 g/L Furfural (Li et al. 2014). Bei *B. licheniformis* DSM 8785

hingegen wurde bereits ab Furfuralkonzentrationen von 0,96 g/L eine Abnahme der Substratverwertung und der Produktbildung beobachtet. Gegenüber 5-HMF wies der Stamm keine Inhibition bis Konzentrationen von 2,56 g/L auf (Jurchescu 2014). Von vier getesteten Nebenprodukten hatte Furfural auf *K. pneumoniae* die höchste Toxizität. Die Inhibierung zeigte sich ab Konzentrationen von 0,2 - 0,4 g/L. 5-HMF wirkte sich ab Konzentrationen von 1 g/L toxisch auf *K. pneumoniae* aus (Nishikawa et al. 1988).

iii) Phenolische Komponenten

Während der Hydrolyse von Lignocellulose entsteht eine Vielzahl an phenolischen Komponenten wie aromatische Alkohole, Säuren und Aldehyde. Die Diversität dieser Gruppe macht die Identifikation und Quantifizierung einzelner Substanzen schwierig. Auch die Mechanismen, die hinter einer Inhibition stehen, sind daher schwierig zu identifizieren. Phenolische Komponenten mit hydrophoben Seitenketten sind allgemein toxischer als andere phenolische Komponenten, da sie sich leichter in die Zellmembran einlagern können. Sobald sich eine Substanz in die Zellmembran eingelagert hat, wird die Integrität der Zellmembran und damit auch ihre Funktion zerstört (Heipieper et al. 1994).

Vanillin und Syringaldehyd sind zwei Abbauprodukte des Lignins und werden häufig als typische Vertreter der Gruppe der phenolischen Komponenten eingesetzt. Zaldivar et al. 1999 zeigte, dass die aromatischen Aldehyde in etwa doppelt so toxisch sind wie Furfural und 5-HMF. Diese Ergebnisse decken sich mit denen von Li et al. 2014, in denen ein *B. licheniformis*-Stamm durch Vanillin mehr gehemmt wurde als durch Furfural. Als Grund für die hohe Toxizität wird die Hydrophobizität der Substanzen vermutet. Heipieper et al. 1999 beschreibt, dass Substanzen mit einem Verteilungskoeffizienten zwischen Octanol und Wasser ($\log p_{ow}$) von > 1 und < 5 besonders toxisch auf Mikroorganismen wirken. Vanillin weist einen $\log p_{ow}$ von 1,2 und Syringaldehyd von 0,99 auf. Übereinstimmend mit diesen Werten wirkte Vanillin auf einen *E. coli* Stamm toxischer als Syringaldehyd (Zaldivar et al. 1999).

Zur Detoxifizierung der aromatischen Komponenten gibt es viele Methoden wie Fällung, Extraktion, Absorption durch Ionentauscher oder der Einsatz von Enzymen wie Laccase oder Peroxidase. Durch eine Entfernung der phenolischen Komponenten sinkt die Toxizität von Hydrolysaten für Mikroorganismen (Jönsson et al. 1998).

3 Material und Methoden

3.1 Chemikalien

Soweit nicht anders vermerkt, wurden alle verwendeten Chemikalien in Analysequalität von AppliChem GmbH (Darmstadt, Deutschland), Carl Roth & Co. (Karlsruhe, Deutschland), Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland) und Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Deutschland) bezogen.

Alle Lösungen wurden mit Reinstwasser einer Direct-Q UV Anlage von Merck Millipore (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) angesetzt.

3.2 Bakterienstämme

Für die Untersuchungen wurden Bakterien der Gattungen *Bacillus*, *Geobacillus* und *Paenibacillus* verwendet.

Die Stämme wurden entweder vom Leibniz-Institut DSMZ – Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH – (Braunschweig, Deutschland) oder von der Agricultural Research Service Culture Collection (NRRL) (Peoria, IL, USA) erworben. Eine Auflistung der Stämme sowie der Stammdatenbank, von der die Stämme bezogen wurden, erfolgt in Tabelle 3.1. Die Bakterienstämme wurden nach Vorgaben der jeweiligen Stammdatenbank in Kultur genommen. Zur langfristigen Lagerung wurden Kryokulturen (siehe Kapitel 3.4.1) angelegt.

Weitere Bakterienstämme wurden aus einem Screening aus natürlichen Umweltproben gewonnen (Kapitel 3.5). Der Großteil der Stämme wurde nicht identifiziert. Die identifizierten Stämme aus dem Screening sind ebenfalls in Tabelle 3.1 aufgelistet.

Tabelle 3.1: Liste der Bakterienstämme, die auf eine 2,3-BDO-Produktion getestet wurden.

Stamm	Zusatz	Stammdatenbank
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	DSM 7	DSMZ
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	NRS-762	NRRL
<i>Bacillus atrophaeus</i>	NRS-213	NRRL
<i>Bacillus licheniformis</i>	DSM 8785	DSMZ
<i>Bacillus licheniformis</i>	B-23318	NRRL
<i>Bacillus licheniformis</i>	B-14209	NRRL
<i>Bacillus licheniformis</i>	B 1-7	Eigenisolat
<i>Bacillus licheniformis</i>	GK 16	Eigenisolat
<i>Bacillus licheniformis</i>	LB 10	Eigenisolat
<i>Bacillus mojavenensis</i>	B-14698	NRRL
<i>Bacillus subtilis</i>	B-571	NRRL
<i>Bacillus subtilis</i>	GB 1	Eigenisolat
<i>Bacillus subtilis inaquosorum</i>	B-23056	NRRL
<i>Bacillus vallismortis</i>	B-14891	NRRL
<i>Geobacillus kaustophilus</i>	NRS-81	NRRL
<i>Geobacillus stearothermophilus</i>	NRS-64	NRRL
<i>Geobacillus thermoglucosidasius</i>	B-14516	NRRL
<i>Paenibacillus polymyxa</i>	B-369	NRRL
<i>Paenibacillus polymyxa</i>	B-510	NRRL
<i>Paenibacillus polymyxa</i>	B-719	NRRL
<i>Paenibacillus polymyxa</i>	DSM 356	DSMZ

3.3 Medien

Alle Medien wurden mit Reinstwasser angesetzt. Als Hefeextrakt wurde granuliertes Hefeextrakt (LOT: VM176253020) der Firma Merck (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) eingesetzt. Als Antischaummittel während der Reaktorkultivierungen wurde Ucolup N-115 von Brenntag Mineralöl GmbH & Co. (Mühlheim/Ruhr, Deutschland) verwendet.

Soweit nicht anders beschrieben, wurden alle Lösungen für die Medienherstellung bei 121 °C für 20 Minuten und einem Bar Überdruck autoklaviert.

3.3.1 Nutrient-Medium

Das Nutrient-Medium wurde zur Herstellung von Kryokulturen verwendet.

Tabelle 3.2: Nutrient-Medium nach Vorgaben der DSMZ (Medium 1)

Substanz	Menge
Pepton	5 g
Fleischextrakt	3 g
Reinstwasser	1000 mL

3.3.2 Nährstoffagarplatten

Als Medium für die Agarplatten wurde handelsüblicher Nähragar (EN ISO 6579, ISO 10273) von Carl Roth & Co. GmbH (Karlsruhe, Deutschland) nach Herstellanweisung angesetzt. Die Zusammensetzung des Nähragars ist gleich zum Nutrient-Medium und enthält zusätzlich 15 g/L Agar.

3.3.3 Defined-Medium

Das Defined-Medium wurde im Screening als Medium zur 2,3-BDO-Produktion mit Risikoklasse-1-Mikroorganismen getestet. Die Zusammensetzung des Mediums ist in Tabelle 3.3 aufgelistet.

Tabelle 3.3: Zusammensetzung des Defined-Mediums nach Perego et al. 2003.

Lösung	Substanz	Konzentration [g/L]
1	Kohlenstoff	Variabel
2	Hefeextrakt	10
	K ₂ HPO ₄	28
	KH ₂ PO ₄	12
	(NH ₄) ₂ SO ₄	4
	C ₆ H ₅ Na ₃ O ₇ · 2 H ₂ O	2
	MgSO ₄ · 7 H ₂ O	0,4

3.3.4 MRS-Medium

Das MRS-Medium wurde ebenfalls als Medium im Screening eingesetzt. Die Zusammensetzung des Mediums ist in Tabelle 3.4 aufgeführt.

Tabelle 3.4: Zusammensetzung des MRS-Mediums nach Li et al. 2013b.

Lösung	Substanz	Konzentration [g/L]
1	Kohlenstoff	Variabel
2	Hefeextrakt	10
	Peptone	20
	Fleischextrakt	20
3	$K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$	8
	$C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2 H_2O$	8
	$NaCH_3COO \cdot 3 H_2O$	14
	$MgSO_4 \cdot 7 H_2O$	0,8

3.3.5 MS-Medium

Die Screeningstämme *G. kaustophilus* NRS-81 und *G. stearothermophilus* NRS-64 wurden in MS-Medium nach Xiao et al. 2012 kultiviert. Die Zusammensetzung ist in Tabelle 3.5 und Tabelle 3.6 aufgeführt.

Tabelle 3.5: Zusammensetzung MS-Medium nach Xiao et al. 2012.

Substanz	Konzentration [g/L]
Glucose / Xylose	50
$K_2HPO_4 \cdot 3 H_2O$	2,28
$NaH_2PO_4 \cdot 2 H_2O$	0,47
$(NH_4)_2SO_4$	1,32
$MgSO_4$	0,12
Spurenelementlösung	1 mL

Tabelle 3.6: Spurenelementlösung für das MS-Medium nach Xiao et al. 2012.

Substanz	Konzentration [g/L]
$CaCl_2$	2,63
$FeSO_4 \cdot 7 H_2O$	0,72
$ZnSO_4 \cdot 7 H_2O$	0,46
$MnSO_4 \cdot H_2O$	0,22

3.3.6 *Bacillus thermoglucosidasius* Medium

Zur Kultivierung des Stamms *G. thermoglucosidasius* wurde das empfohlene *Bacillus thermoglucosidasius* Medium der DSMZ verwendet.

Tabelle 3.7: *Bacillus thermoglucosidasius* Medium nach Vorgaben der DSMZ (Medium 305)

Substanz	Menge [g/L]
Glucose / Xylose	50
Lösliche Stärke	10
Pepton	5
Fleischextrakt	3
Hefeextrakt	3
KH ₂ PO ₄	3

3.3.7 Basal-Medium

Für das Screening und als Basis für die nachfolgenden Experimente diente das Basal-Medium nach Nakashimada et al. 1998, das ursprünglich für die 2,3-BDO-Produktion mit *P. polymyxa* ATCC 12321 verwendet worden ist. In Tabelle 3.8 sind die Medieninhaltsstoffe und Konzentrationen angegeben.

Tabelle 3.8: Zusammensetzung des Basal-Mediums nach Nakashimada et al. 1998.

Lösung	Substanz	Konzentration [g/L]
1	Kohlenstoff	20 - 240
2	Hefeextrakt	5
	Trypton aus Casein	5
3	K ₂ HPO ₄	7
	KH ₂ PO ₄	5,5
4	(NH ₄) ₂ SO ₄	1
	MgSO ₄ · 7 H ₂ O	0,25
	Na ₂ MoO ₄ · 2 H ₂ O	0,12
	CaCl ₂ · 2 H ₂ O	0,021
5	Co(NO ₃) ₂ · 6 H ₂ O	0,029
	(NH ₄) ₂ Fe(SO ₄) ₂ · 6 H ₂ O	0,039
6	Spurenelementlösung	10 mL

Tabelle 3.9 zeigt die Zusammensetzung der Spurenelementlösung, die für das Basal-Medium verwendet wurde.

Tabelle 3.9: Zusammensetzung der Spurenelementlösung für das Basal-Medium.

Substanz	Konzentration
	[g/L]
Nicotinsäure	0,2
Na ₂ SeO ₃ · 5 H ₂ O	0,0262
NiCl ₂ · 6 H ₂ O	0,0037
MnCl ₂ · 4 H ₂ O	0,5
H ₃ BO ₃	0,1
AlK(SO ₄) ₂ · 12 H ₂ O	0,0172
CuCl ₂ · 2 H ₂ O	0,001
Na ₂ EDTA · 2 H ₂ O	0,554

Die einzelnen Lösungen des Basal-Mediums wurden getrennt voneinander angesetzt und autoklaviert. Durch dieses Vorgehen wurden wärmeinduzierte Reaktionen wie die Maillard-Reaktion verhindert. Lösung 5 und 6 wurden nicht autoklaviert, sondern mittels Filtration (Sterilfilter, Porengröße 0,2 µm) sterilisiert.

Abgesehen vom Medium für die Vorkulturen, wurde das Basal-Medium als Stammlösung (Basal-Stammlösung) hergestellt. Hierfür wurden die Lösungen 2 - 6 in doppelter Konzentration angesetzt und nach dem Autoklavieren bzw. nach der Sterilfiltration miteinander vermengt. Für Lösung 1 wurde eine 400 g/L Glucose- bzw. Xylose-Stammlösung angesetzt. Für die Kultivierungen wurde ein Teil der Basal-Stammlösung in das Kultivierungsgefäß vorgelegt. Anschließend wurde die gewünschte Substratkonzentration mit der Substrat-Stammlösung eingestellt (50-240 g/L) und das Medium mit sterilem Reinstwasser aufgefüllt, sodass das Wasser/Glucose-Gemisch dasselbe Volumen aufwies, wie die vorgelegte Basal-Stammlösung (Mischung 1:1).

3.3.8 Modifiziertes Basal-Medium (Basal-HE-Medium)

Soweit nicht anders erwähnt, wurden alle Kultivierungen im Basal-HE-Medium durchgeführt. Die Lösungen 1, 2, 4, 5 und 6 entsprechen den Lösungen des Basal-Mediums. Die 5 g/L Trypton der Lösung 3 des Basal-Mediums, wurden in der Basal-HE-Variante durch dieselbe Menge Hefeextrakt substituiert. Die Lösung 3 enthielt somit 10 g/L Hefeextrakt und kein Trypton. Das Medium wurde nach den Vorgaben des Basal-Mediums hergestellt.

3.3.9 Modifiziertes Basal-HE-Medium für *Bacillus mojavensis*

Für die Versuche zur maximalen initialen Glucosekonzentration wurde *B. mojavensis* B-14698 in einem modifizierten Basal-HE-Medium kultiviert. Das Medium war bis auf Lösung 4 identisch zum Basal-HE-Medium. In Lösung 4 waren 2,0 g/L (NH₄)₂SO₄, 0,5 g/L MgSO₄ · 7 H₂O, 0,12 g/L Na₂MoO₄ · 2 H₂O und kein CaCl₂ · 2 H₂O enthalten (vergl. Tabelle 3.8).

3.3.10 Synthetisches Hydrolysat

Als Basis-Medium wurde das Basal-HE-Medium mit 100 g/L Glucose bzw. Xylose verwendet. Das Medium wurde zusätzlich mit 0,3 M Morpholinoethansulfonsäure (MES) als Puffer auf einen pH-Wert von $6,6 \pm 0,1$ gepuffert. MES ist nicht thermostabil. Alle Medienbestandteile wurden daher zusammen angesetzt und das gesamte Medium mit einem Bottle-Top-Filter (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland; Porengröße 0,2 μm) sterilfiltriert. Des Weiteren wurden dem Medium verschiedene Substanzen zugesetzt, die bei der Gewinnung von Holz-Hydrolysat entstehen können (Tabelle 3.10). Die Konzentrationen der Substanzen richten sich nach Literaturwerten von Jurchescu 2014.

Tabelle 3.10: Zusätze für das synthetische Holz-Hydrolysat abgeleitet nach Jurchescu 2014.

Substanz	Konzentration [g/L]
Furfural	0,12
5-Hydroxymethylfurfural	0,16
4-Hydroxybenzoesäure	0,3
Vanillin	0,014
Syringaldehyd	0,02
Essigsäure	1,2
Ameisensäure	3,6

Für das synthetische Ultra- und Nanofiltrat wurden die Zuckerkonzentrationen der jeweiligen Filtrate eingesetzt sowie die Mengen an Nebenprodukten, die in den Hydrolysaten nachgewiesen worden sind Tabelle 3.11.

Tabelle 3.11: Synthetisches Ultra- und Nanofiltrat.

Substanz	Ultrafiltrat [g/L]	Nanofiltrat [g/L]
L-Arabinose	0,61	2,17
D-Galactose	0,71	1,79
D-Glucose · H ₂ O	3,25	1,9
L-Rhamnose · H ₂ O	0,80	1,64
D-Xylose	87,10	57,46
Na-Acetat · 3 H ₂ O	4,58	3,25
5-HMF	0,013	0,014
Furfural	0,071	0,084
Syringaldehyd	0,0172	0,0296

3.4 Stammhaltung und Kultivierung

3.4.1 Kryokonservierung

Für eine langfristige Lagerung der Kulturen und zur Nutzung als Inokulum von Vorkulturen, wurden Kryokulturen angelegt. Hierfür wurden 50 mL Nutrient-Medium in einen 300 mL Erlenmeyerkolben mit drei Schikanen abgefüllt und mit 700 µL einer bereits bestehenden Kryokultur bzw. einer Kolonie von einer Agarplatte angeimpft. Die Kulturen wurden anschließend bei 30 °C und 100 rpm bei einem Schütteldurchmesser von 50 mm für 16 – 20 h kultiviert. 700 µL der Kulturen wurden mit 700 µL sterilem Pharmaglycerin in Kryoaliquots vermischt, mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und schließlich bei -80 °C gelagert. Zur Wiederverwendung der Aliquots wurden diese bei Raumtemperatur aufgetaut.

3.4.2 Vorkulturen

Für die Vorkulturen wurden 50 mL Basal-Medium bzw. Basal-HE-Medium mit 20 g/L Kohlenstoffquelle in einem 300 mL Erlenmeyerkolben mit drei Schikanen überführt. Die Kohlenstoffquelle richtete sich dabei nach der Kohlenstoffquelle, die in der Hauptkultur verwendet werden sollte. Für die Screening-Versuche wurde die Vorkultur mit einem 1:1 Glucose/Xylose-Gemisch angesetzt. Als Inokulum wurden in der Regel 700 µL einer Kryokultur verwendet. Im Screening wurden die Stämme auf Agarplatten gehalten und die Vorkulturen mit einer Impföse einer Kolonie von den Agarplatten verwendet. Die beimpften Kulturen wurde, soweit nicht anders erwähnt, bei einer Temperatur von 30 °C und einer Schüttelfrequenz von 100 rpm bei einem Schütteldurchmesser von 50 mm für 16 – 24 h inkubiert.

3.4.3 Kultivierungen in der Mikrotiterplatte

96-Well Mikrotiterplatte

Für die Kultivierungen in 96-Well Mikrotiterplatten (MTP) wurden Polystyrol-MTP der Firma Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland) verwendet. Die Wells waren in 8 Reihen (a - h) und 12 Spalten (1 - 12) aufgeteilt. Die Wells wiesen eine runde Geometrie mit Flachboden auf. Die Wells wurden mit einem Füllvolumen von jeweils 200 µL bestückt. Dabei wurden die Wells der äußeren zwei Reihen und Spalten (Reihe a, b, g und h sowie Spalte 1, 2, 11 und 12) jeweils mit 200 µL sterilem Reinstwasser befüllt, um Verdunstungseffekte zu minimieren. Die Platten wurden mit Polystyroldeckeln abgedeckt und die geschlossenen Platten mit Parafilm abgedichtet. Die Kultivierung erfolgte in beheizbaren Mikrotiterplatteninkubatoren (PST-60HL-4, Biosan, Riga, Latvia bzw. Kisker Biotech, Steinfurt, Deutschland) mit einer Schüttelauslenkung von 2,5 mm. Soweit nicht anders erwähnt, wurden die Platten mit 700 rpm geschüttelt.

Medien für die MTP-Kultivierung wurden als 10 mL Ansatz in Schraubröhren angesetzt und mit 1 Vol.-% Inokulum beimpft. Das beimpfte Medium wurde anschließend in die Wells pipettiert. Mit diesem Vorgehen wurde sichergestellt, dass die Ansätze einheitlich beimpft waren.

24-Well Mikrotiterplatte

Für die Kultivierung in 24-Well MTP wurden Polystyrolplatten von Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland) mit runden Geometrien und Flachboden verwendet. Das Füllvolumen betrug je 1 mL pro Well. Die obere und untere Reihe wurde mit sterilem Reinstwasser befüllt, um Verdunstungseffekte zu vermeiden. Die Platten wurden mit einem Polystyroldeckel verschlossen, der mit Heftband an den Platten fixiert wurde. Soweit nicht anders erwähnt, wurden die Platten bei 320 rpm und 39 °C inkubiert (PST-60HL-4, Kisker Biotech, Steinfurt, Deutschland). Die einzelnen Wells der 24-Well MTP wurden mit dem jeweiligen Medium befüllt und anschließend mit einem Inokulum von 2 Vol.-% beimpft.

3.4.4 Kultivierungen im Schüttelkolben

Kultivierungen im Schüttelkolben erfolgten in 300 mL Erlenmeyerkolben mit drei Schikanen. Unter Standardbedingungen, wurden die Kolben mit 60 mL Medium gefüllt und bei einer Schüttelfrequenz von 125 rpm mit einem Schütteldurchmesser von 50 mm (Infors HT Minitron oder Multitron, Infors AG, Bottmingen, Basel) und einer Temperatur von 39 °C inkubiert. Die Standardbedingungen wurden, soweit nicht anders erwähnt, für alle Screeningversuche angewendet. Die Kolben wurden mit 1 Vol.-% der jeweiligen Vorkultur beimpft.

Die Beprobung der Kolben erfolgte unter einer Sterilbank (HeraSafe, Heraeus Instruments GmbH, Hanau, Deutschland). Hierfür wurden die Kolben kurzzeitig dem Inkubator entnommen. Bei Versuchen die länger als 24 h oder bei Temperaturen über 39 °C kultiviert worden sind, wurde zusätzlich bei jeder Probenahme ein Verdunstungsausgleich mit sterilem Reinstwasser durchgeführt. Die Verdunstungsmenge wurde gravimetrisch bestimmt.

3.4.5 Kultivierungen im DASbox[®] Reaktorsystem

Für die Kultivierung im Bioreaktor wurde ein DASbox[®]-Minireaktorsystem der Firma Eppendorf/DASGIP genutzt. Die Anlage bestand aus vier baugleichen Bioreaktoren, die parallel betrieben werden konnten. Die technischen Daten für die DASbox[®] sowie die Standardkultivierungsbedingungen mit Glucose oder Xylose als Substrat sind in Tabelle 3.12 aufgelistet.

Tabelle 3.12: Technische Daten der DASbox®-Bioreaktoranlage und Standardkultivierungsbedingungen mit Glucose oder Xylose als Substrat.

Komponente	Technische Daten DASbox®	Standard-kultivierung mit Glucose	Standard-kultivierung mit Xylose
Antrieb	Überkopfantrieb	-	-
Rührer	Rushton-Typ-Rührer mit 6 Flügeln	-	-
Abgaskondensator	Peltier (flüssigkeitsfrei)	-	-
Begasung	L-Sparger	-	-
Temperierung	Peltier (flüssigkeitsfrei)		
Abgasanalysator - GA4-Modul	O ₂ -Sensoren: Zirkoniumdioxid CO ₂ -Sensoren: Zweistrahl-Infrarot	-	-
Sensoren	pH-Elektrode (Hamilton) pO ₂ -Elektrode (Hamilton)	-	-
Arbeitsvolumen	60 – 250 mL	100 mL	100 mL
Begasungsrate	0 – 25 sL/h	25 sL/h	25 sL/h
Gasmischung	Luft, O ₂ , CO ₂ , N ₂	Luft	Luft
Rührerfrequenz	0 – 2500 rpm	600 rpm	300 rpm
Temperatur	10 – 60 °C	37 °C	37 °C
pH-Wert-Regelung	mit NaOH	> 5,0 mit 2 M NaOH	> 5,8 mit 4 M NaOH

Die Reaktoren wurden im Leerzustand bei 121 °C für 20 min autoklaviert. Nach dem Abkühlen der Reaktoren wurden diese mit sterilem Basal-HE-Medium unter sterilen Bedingungen unter einer Sterilbank befüllt. Zusätzlich zum Medium wurden 300 µL steriles Antischaummittel (Ucolub N-115, Brenntag Mühlheim/Ruhr, Deutschland) in die Reaktoren pipettiert. Die Anschlussstutzen in den Kopfplatten der Reaktoren wurden während des Autoklavierens mit Septen verschlossen. Nach dem Befüllen der Reaktoren wurden die Septen entfernt und die Sonden (pH-Sonde und pO₂-Sonde) eingebaut. Vor dem Einbau der Sonden wurden diese mittels Reinstwasser gereinigt und mit Ethanol desinfiziert. Die pO₂-Sonde wurde vor dem Einbau an die DASbox® angeschlossen und für mindestens 8 h polarisiert. Die Kalibrierung der Sonde erfolgte durch die Begasung des Medium in den vollständig aufgebauten Reaktoren im Medium mittels Stickstoff- (Nullpunktbestimmung) und Luftbegasung. Die pH-Sonde wurde mit Pufferlösungen pH 4,01 und pH 7,00 nach dem Einschalten der DASbox®-Anlage kalibriert. Das Abgasanalysator-Modul wurde an den Abluftfilter des Abgaskondensators angeschlossen. Das Modul wurde im Abstand von 30 Tagen mit einer Einpunktkalibrierung mit Luft kalibriert.

Nachdem alle Kultivierungsparameter eingestellt waren (Temperatur, Begasung, Rührerfrequenz) wurden die Reaktoren mit 1 Vol.-% einer Schüttelkolben-Vorkultur inokuliert. Die Datenaufzeichnung erfolgte mit der DASware control Software. Die Probenahme für die offline Analytik erfolgte mit einer sterilen Spritze über ein Probenahme-steigrohr.

Für die Fed-Batch-Kultivierungen im Reaktor wurden alle zugefügten Medienbestandteile als Trockensubstanz eingewogen. Die Zusammensetzung der Feeds wurde variiert, diese sind im jeweiligen Kapitel beschrieben. Der eingewogene Feed wurde bis zur Verwendung trocken im Exsikkator gelagert. Die Zugabe erfolgte über einen Anschlussstutzen im Reaktordeckel. Die Zugabe von Lösung 6 (Spurenelementlösung) erfolgte im flüssigen Zustand.

3.5 Screening nach neuen 2,3-Butandiol Produzenten

Für die Arbeit sollten neue 2,3-BDO-Produzenten gefunden und gegebenenfalls charakterisiert werden. Hierfür wurden zunächst Stammanforderungen formuliert:

- Risikogruppe-1-Mikroorganismus (S1)
- Hohe 2,3-BDO-Produktion (Endkonzentration/Ausbeute)
- Verwertung hoher Substratkonzentrationen
- Verwertung von Xylose
- Thermophil (Zusatzanforderung für das Screening aus Umweltproben)

Für das Screening nach neuen, potentiellen 2,3-BDO Produzenten wurden zwei Ansätze verfolgt, um neue Mikroorganismen zu finden. Im ersten Ansatz wurde nach bekannten 2,3-BDO-Produzenten in der Literatur geforscht. Anschließend wurde im phylogenetischen Stammbaum nach nahen Verwandten gesucht. Ausgewählte Mikroorganismen weisen mit diesem Vorgehen ähnliche Eigenschaften auf, wie die bereits bekannten Stämme. Vorteil dieser Strategie zur Beschaffung neuer Mikroorganismen ist, dass das primäre Kriterium eines S1-Mikroorganismus direkt überprüft werden kann.

Im zweiten Ansatz wurden Bakterien aus Umweltproben isoliert. Die Herkunft der Proben hat einen Einfluss auf die Wahrscheinlichkeit Risikoklasse-1-Mikroorganismen zu isolieren. Bei Proben aus Böden ist die Wahrscheinlichkeit hoch. Zudem kommen bekannte S1-Mikroorganismen wie *B. licheniformis* und *P. polymyxa* natürlicherweise im Boden vor. Aus diesen zwei Gründen wurden Proben aus Böden gescreent. Um Mikroorganismen mit gewünschten Eigenschaften zu finden, ist es sinnvoll, Proben von Standorten zu nehmen, an denen bereits eine natürliche Selektion stattgefunden hat. Eine Stammeigenschaft sollte die Thermophilie sein. Daher wurden ebenfalls Proben aus einem Kompost sowie Proben von unbehandelten, ungewaschenen Erdnüssen aus Afrika (Veggie's Delight, Düsseldorf, Deutschland) gescreent.

Je 1 g der Umweltproben wurden in 10 mL 0,9 % NaCl gelöst. Die Lösung wurde für etwa 5 min suspendiert. Bis zum Absetzen der Feststoffpartikel wurde die Probe stehen gelassen und anschließend 100 µL des Überstandes auf Nährstoffagarplatten (siehe Kapitel 3.3.2) ausgestrichen. Die Platten wurden bei 50 °C über Nacht aerob oder anaerob inkubiert. Die gebildeten Kolonien wurden mittels eines Holzstäbchens von den Platten gepickt und auf neue Platten übertragen. Pro Platte wurden 9 Kolonien kultiviert (Abbildung 3.1).

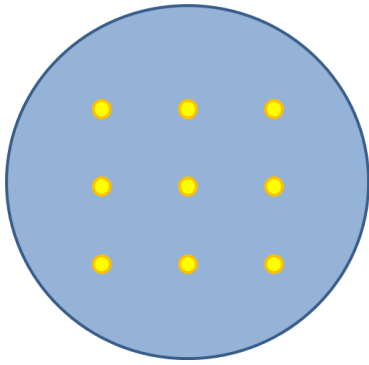


Abbildung 3.1: Schema vereinzelter Kolonien auf einer Agarplatte.

Die gepickten Kolonien wurden bei 50 °C in Basal-HE-Medium mit 50 g/L Glucose in 96-Well MTP bei 700 rpm für 24 h kultiviert. Alle Kultivierungen wurden mittels Voges-Proskauer-Test auf Acetoin getestet. Positive Kulturen wurden in Basal-HE-Medium mit Xylose kultiviert. Die Verwertung der Xylose wurde indirekt über die optische Dichte bestimmt.

Kultivierungen, die in allen Tests positive Ergebnisse erzielten, wurden erneut in Basal-HE-Medium mit 50 g/L Glucose kultiviert. Die Kultivierungen liefen in 96-Well MTP bei 50 °C und 700 rpm für 24 h. Anschließend wurden die Kulturen in 1,5 mL Reaktionsgefäße überführt, bei 21.100 g für 10 min bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und das Pellet verworfen. Die Proben wurden mittels HPLC (siehe Kapitel 3.8.6) auf 2,3-BDO untersucht.

3.6 Einsatz von Xylan und Hemicellulose als Kohlenstoffquelle

3.6.1 Enzymatischer Aufschluss von Birkenholz-Hemicellulose-Hydrolysat

Für den enzymatischen Aufschluss wurde der pH-Wert der Hydrolysate mittels CaCO_3 auf pH 5,2 eingestellt. Anschließend wurden die Hydrolysate mit etwa 0,05 g Biogazyme 2 x (ASA Spezialenzyme, Wolfenbüttel, Deutschland) pro Gramm Feststoffanteil versetzt. Die Inkubation erfolgte in einem Schüttelinkubator mit einem Schütteldurchmesser von 50 mm (Infors HT Minitron oder Multitron, Infors AG, Bottmingen, Basel) bei 50 °C und 100 rpm für 65 h in einer 500 mL Schottflasche. Nach der Inkubation wurden die Hydrolysate bei 10.016 g für 15 min bei Raumtemperatur in 50 mL Schraubröhren zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und das Pellet verworfen.

3.6.2 Säureaufschluss von Birkenholz-Hemicellulose-Hydrolysat

Zur Bestimmung der Gesamt-Xylosekonzentration in den Hydrolysaten wurde ein Säureaufschluss mit Schwefelsäure durchgeführt.

8,4 mL der Hydrolysate wurden mit 0,3 mL 72 % Schwefelsäure vermischt. Anschließend wurde die Lösung bei 121 °C und einem bar Überdruck für 60 min in geschlossenen

30

Schraubröhren autoklaviert. Um zu ermitteln, wie viel Zucker bei dieser Prozedur zu Nebenprodukten wie 5-HMF oder Furfural umgewandelt werden, wurde ein Zuckerreferenzstandard angefertigt (Tabelle 3.13). Von dem Zuckerstandard wurden ebenfalls 8,4 mL mit 0,3 mL 72 % Schwefelsäure versetzt und autoklaviert.

Nach der thermischen Behandlung wurde der pH-Wert der Hydrolysate und des Zuckerreferenzstandards mit CaCO_3 auf einen pH-Wert zwischen 5 und 6 angehoben. Nach Erreichen des gewünschten pH-Wertes ruhten die Proben, bis sich das CaCO_3 abgesetzt hatte. Der Überstand wurde dekantiert und die Zuckergehalte mittels HPLC analysiert.

Tabelle 3.13: Zuckerreferenzstandard für den Säureaufschluss mit 72 %iger Schwefelsäure.

Monosaccharid	Menge [g/100 mL]
Xylose	5
Glucose	0,5
Arabinose	0,5
Mannose	0,5
Galactose	0,5

3.6.3 Xylane als Modellsubstrat

Im Screening wurden drei Xylane unterschiedlicher Herkunft als Modellsubstrate verwendet. Die Mikroorganismen wurden mit diesen Substraten hinsichtlich der Fähigkeit zur Verwertung von komplexen Substraten getestet. Es wurde ein Xylooligosaccharid ($\geq 95\%$) aus Mais (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland), ein Xylan aus Buche (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) und ein Haferspелzenxylan mit einer Molmasse von 24000 g/mol (Thünen Institut für Holzforschung, Hamburg, Deutschland) eingesetzt.

Die drei Xylane unterschieden sich im Wesentlichen in ihren Molmassen. Das Maisxylan wies den größten Anteil an kurzkettigen Xylanen auf (Xylooligosaccharide $\geq 95\%$). Die Buchen- und Haferspелzenxylane wiesen mehr hochmolekulare Xylane auf. Mittels HPLC konnten zwei Fraktionen unterschieden werden. Die erste Fraktion wies eine Retentionszeit von 6,71 min auf. Dies ist die Fraktion der höheren Molmasse und wird im weiteren Verlauf der Arbeit als Polysaccharidfraktion bezeichnet. Die zweite Fraktion eluierte nach einer Retentionszeit von 7,54 min. Die zweite Fraktion wird als Oligosaccharidfraktion bezeichnet.

Für das Screening wurden je 1 g Xylan in 50 mL Schraubröhren eingewogen und in 20 mL Basal-HE-Medium mit 0,1 M MES pH $6,6 \pm 0,1$ gelöst. Zum Lösen des Haferspелzenxylans und des Buchenxylans wurde das Medium leicht erwärmt (50 °C im Wasserbad für 10 - 20 min). Das Buchenxylan wies eine sehr geringe Löslichkeit auf, sodass immer ein Bodensatz an Xylan in den Reaktions-/Probengefäßen vorlag, der nicht gelöst werden konnte. Der 20 mL Ansatz wurde geteilt und zu je 10 mL in 15 mL Schraubröhren überführt. Ein Ansatz wurde mit Biogazyme 2 x (ASA Spezialenzyme, Wolfenbüttel, Deutschland) (0,05 g pro Gramm Xylan) versetzt. Dem anderen Ansatz wurde kein Enzym zugefügt. Beide Ansätze wurden mit

je 1 Vol.-% einer Vorkultur beimpft. Die Inokulation erfolgte unmittelbar nach der Zugabe des Enzymgemischs. Anschließend wurden die Ansätze in 96-Well MTP überführt. Die Kultivierungsbedingungen sind in Tabelle 3.14 aufgeführt.

Tabelle 3.14: Kultivierungsbedingungen im Screening mit Xylan als Modells substrat. Durchgeführt in 96-Well MTP.

Parameter	Kultivierungsbedingungen
Füllvolumen	200 µL
Temperatur	39 °C (<i>B. atrophaeus</i> und <i>B. vallismortis</i>) 41 °C (<i>B. licheniformis</i> und <i>B. mojavensis</i>)
Schüttelfrequenz	700 rpm

Direkt nach den Probennahmen der Ansätze mit Enzym, wurde das Enzym thermisch inaktiviert. Hierfür wurden die Proben für 10 min im Wasserbad auf 90 °C temperiert. Anschließend wurden die Proben für 10 min bei 21.100 g bei Raumtemperatur zentrifugiert. Zur Bestimmung der Substrat- und Produktgehalte wurde der Überstand verwendet.

3.6.4 Hemicellulose aus Birkenholz

Für die Kultivierung mit Xylose aus einem Birkenholz-Hemicellulose-Extrakt, waren mehrere Prozessschritte nötig, um dieses als Substrat nutzen zu können. Abbildung 3.2 zeigt den Prozess zur Nutzung von Birkenholz-Hemicellulose für die 2,3-BDO-Kultivierung.

In dieser Arbeit wurde ein Birkenholz-Hemicellulose-Hydrolysat verwendet, dass von der Lappeenranta University of Technology zur Verfügung gestellt wurde. Die Hemicellulose wurde mittels Heißwasserextraktion aus dem Birkenholz gewonnen. Die Extraktion verlief bei 160 °C für 90 min. Es wurden 59,4 kg Extrakt gewonnen mit einer relativen Dichte von > 4 °Brix. Das Hydrolysat enthielt 35,8 g/L TDS (Total Dissolved Solids), 5,6 g/L Lignin, 5,2 g/L Monosaccharide, 2,2 g/L Hemicellulose, 2,6 g/L Ameisensäure, 1,9 g/L Essigsäure und 0,5 g/L Furfural.

Das Hydrolysat wurde mittels Ultrafiltration mit einer 10 kDa Membran auf 3,4 kg konzentriert. Das Konzentrat wird im Folgenden als Ultrafiltrat (UF) bezeichnet. Das Permeat der Ultrafiltration wurde nochmals mittels Nanofiltration (NF270 Membran) konzentriert. Es wurden 45,3 kg des Permeats eingesetzt und auf 11,3 kg konzentriert. Diese Fraktion wird als Nanofiltrat (NF) bezeichnet.

Zur Verwendung der Hydrolysatfraktionen wurde eine enzymatische Verzuckerung mit Biogazyme 2 x durchgeführt. Hierfür wurden je 300 mL des Ultra- und Nanofiltrats eingesetzt. Der pH-Wert wurde mittels CaCO₃ auf 5,2 eingestellt. Das Ultrafiltrat wurde mit 1,38 g und das Nanofiltrat mit 0,98 g Biogazyme 2 x (entspricht etwa 0,05 g Enzym pro Gramm TDS) versetzt und inkubiert (siehe Kapitel 3.6.1).

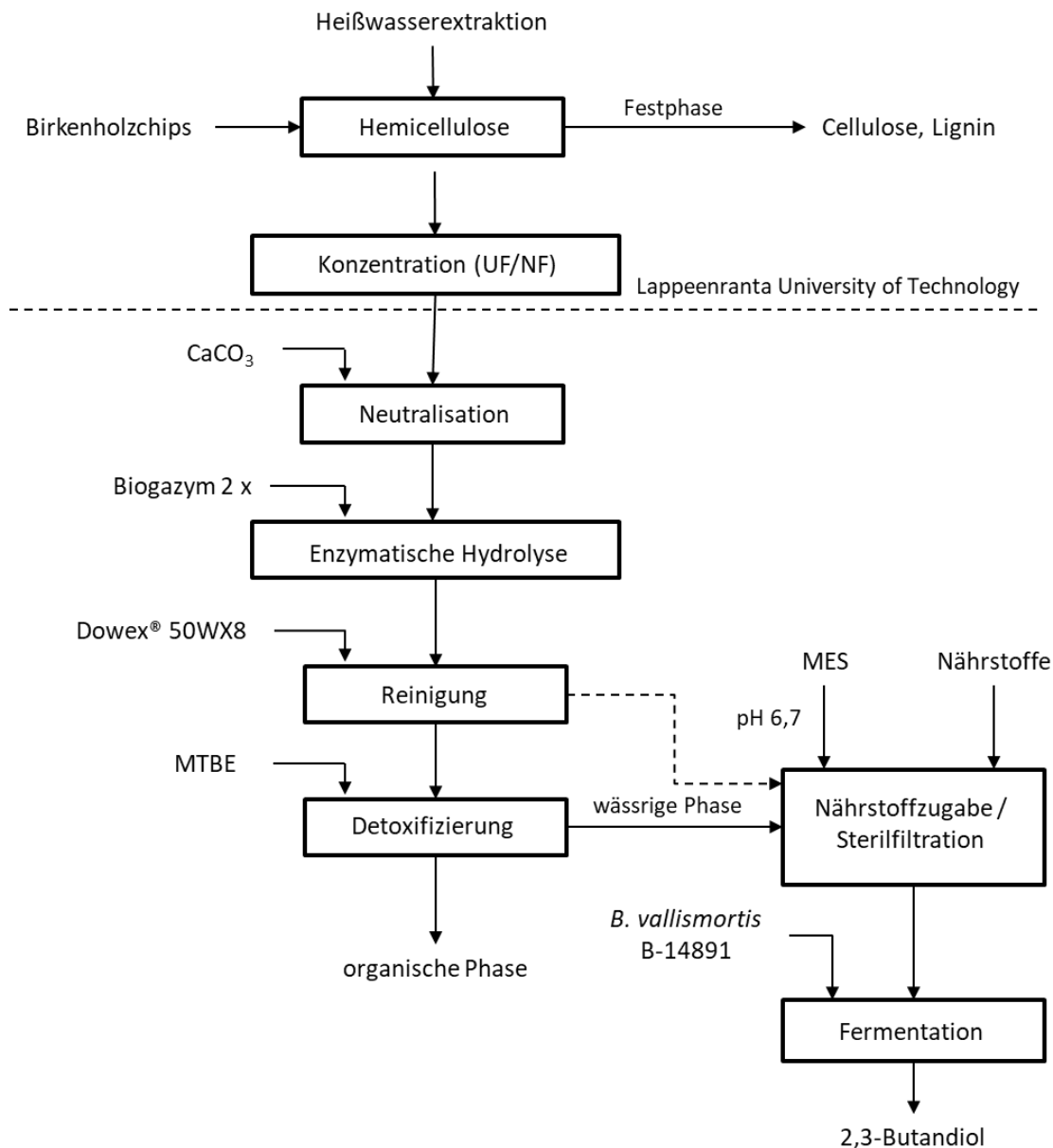


Abbildung 3.2: Prozessschema zur Nutzung von Birkenholz-Hemicellulose als Kohlenstoffquelle für die Kultivierung mit *B. vallismortis* B-14891. Bis zur gestrichelten Linie wurde das Hydrolysat von der Lappeenranta University of Technology gefertigt und zur Verfügung gestellt. UF: Ultrafiltrat, NF: Nanofiltrat.

Nach der Inkubation wurden die Hydrolysate bei 10.016 g für 15 min bei Raumtemperatur in 50 mL Schraubröhren zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und das Pellet verworfen. Überschüssige Ca^{2+} -Ionen wurden mit einem Kationentauscher (Dowex® 50WX8) entfernt. Es wurde eine Säule mit einem Durchmesser von 5 cm mit ca. 6 cm des Tauschers gepackt. Zur Konditionierung wurde der Tauscher mit deionisiertem Wasser gespült, bis ein pH-Wert von etwa 7 erreicht wurde. Die Flussrate konnte über ein Ablassventil geregelt werden. Überschüssiges Wasser wurde mittels Druckluft aus der Säule entfernt. Nachdem die Säule konditioniert war, wurde die erste Hydrolysatfraktion auf die Säule aufgegeben. Über das Ablassventil wurde eine Flussrate von etwa 10 - 20 mL/min eingestellt.

Nach dem Durchlauf des ersten Hydrolysats wurde der Kationentauscher mit deionisiertem Wasser gewaschen, anschließend mit einer 125 mM Schwefelsäure regeneriert und erneut konditioniert. Nach der Konditionierung wurde die zweite Hydrolysatfraktion mit dem Kationentauscher gereinigt.

Den Hydrolysaten wurden essentielle Medienbestandteile zugefügt (Tabelle 3.15). Zusätzlich wurden die Hydrolysate mit 0,1 M MES gepuffert und der pH-Wert mit NaOH-Plätzchen und einer 50 %igen NaOH-Lösung auf einen pH-Wert von $6,6 \pm 0,1$ eingestellt. Die Hydrolysate wurden mittels Filtration sterilisiert.

Tabelle 3.15: Medienzusätze für das Ultra- und Nanofiltrat.

Substanz	Konzentration [g/L]
Hefeextrakt	10
K ₂ HPO ₄	7
KH ₂ PO ₄	5,5
(NH ₄) ₂ SO ₄	1
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	0,25
Na ₂ MoO ₄ · 2 H ₂ O	0,12
CaCl ₂ · 2 H ₂ O	0,021

3.6.5 Detoxifizierung von Birkenholz-Hemicellulose-Hydrolysat

3.6.5.1 Anionentauscher

Zur Entfernung von Acetat aus dem Birkenholz-Hydrolysat wurden vier schwache Anionentauscher getestet (Tabelle 3.16).

Tabelle 3.16: Matrix, aktive Gruppen und typische Anwendungen der vier getesteten Anionentauscher.

Name	Matrix / Aktive Gruppe	Anwendungen
Amberlite [®] IRA-96	Styrol-Divinylbenzol / Tertiäre Amine	Entfernung starker Säuren aus Wasser
Amberlyst [®] A21	Styrol-Divinylbenzol / Tertiäre Amine	Entfernung Inhibitoren von Monomeren
Dowex [®] 66	Styrol-Divinylbenzol / Tertiäre Amine	Polishing von Fructose-Sirup
Lewatit [®] VP OC 1065	Quervernetztes Polystyrol / Primäre Amine (Benzylamin)	Adsorption von Substanzen mit Säuregruppe

Zur Präparation von Anionentauschersäulen wurden Spritzenzylinder mit Glaswolle gefüllt. Die Glaswolle wurde mit dem Kolben der Spritze verdichtet. Die Höhe der Glaswolle-Schicht betrug nach der Verdichtung etwa 1 cm. Anschließend wurden 2 g der Tauschermaterialien in die Spritzenzylinder überführt (Abbildung 3.3).

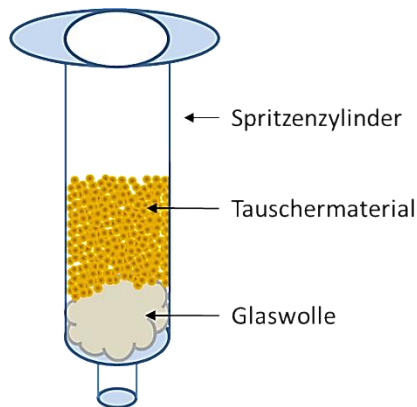


Abbildung 3.3: Präparation der Anionentauschersäulen.

Der pH-Wert ist ein entscheidender Faktor zur Entfernung von Acetat mittels Anionentauscher. Zur Detoxifizierung der Hydrolysatproben wurde der pH-Wert mit einer 50 %igen NaOH-Lösung auf pH 7 eingestellt. Es wurden 15 mL Hydrolysat (Probe) eingesetzt. Nachdem das Hydrolysat einen pH-Wert von 7 aufwies, wurde es mit Reinstwasser auf insgesamt 30 mL aufgefüllt. Durch die pH-Werteinstellung ergibt sich so ein Verdünnungsfaktor von 1:2.

Die Ionentauscher wurden mit Wasser (pH 7) konditioniert. Hierfür wurden jeweils 5 mL Wasser (pH 7) auf die Säule aufgegeben. Nach einer Inkubationszeit von 5 min wurde das Wasser langsam über ein Ablassventil abgelassen. Restliches Wasser wurde über ein angelegtes Vakuum entfernt. Die Prozedur wurde insgesamt dreimal durchgeführt.

Nach der Konditionierung wurden 5 mL der vorbereiteten Probe auf die Tauschersäulen aufgetragen. Das Ablassventil war geschlossen und wurde nach einer Inkubationszeit von 5 min geöffnet. Das Ventil wurde so weit geöffnet, dass die Proben tröpfchenweise in eine 15 mL Schraubröhre liefen. Nachdem keine Probe mehr aus dem Ventil tropfte wurde ein Vakuum angelegt um die restliche Probe vom Tauschermaterial zu ziehen (Abbildung 3.4).

Die Schraubröhren wurden ausgetauscht und die Säulen wurden mit 5 mL Wasser (pH 7) gespült. Das Waschwasser verblieb ebenfalls 5 min auf der Säule, bevor das Ablassventil geöffnet wurde und die Waschfraktion in den Schraubröhren aufgefangen wurde. Insgesamt wurden die Säulen zwei Mal gewaschen. Die Waschfraktionen wurden einzeln aufgefangen und analysiert (Wash 1 und Wash 2)

Die Hydrolysatproben und die beiden Waschfraktionen wurden in der HPLC auf ihren Xylose- und Acetatgehalt hin untersucht.



Abbildung 3.4: Versuchsaufbau der Detoxifizierung mittels Anionentauscher und RP-Phase (rechts).

3.6.5.2 Umkehrphase (RP-Phase)

Analog zu den Anionentauschern wurde eine Umkehrphase (RP-Phase = Reversed Phase) getestet (Abbildung 3.4). Hierfür wurde eine kommerziell erhältliche Strata® C18-E Säule (Phenomenex, Inc., Torrance, CA, USA) verwendet. Für eine Entfernung von Acetat mittels RP-Phase muss die Probe einen sauren pH-Wert aufweisen. Das vorbehandelte Hydrolysat wies einen pH-Wert von $< 2,5$ auf. Aufgrund des niedrigen pH-Wertes musste die Probe nicht weiter behandelt werden und konnte direkt auf die Säule aufgetragen werden.

Die Konditionierung und Durchführung des Versuches erfolgte gleich zu den Anionentauschern (vergl. Kapitel 3.6.5.1).

3.6.5.3 Flüssig-Flüssig-Extraktion

Vorversuche zur Flüssig-Flüssig-Extraktion wurden mit 500 μL UF-Hydrolysat und 400 μL organischen Lösungsmitteln durchgeführt. Für die Extraktion musste der pH-Wert $< 2,5$ liegen. Dies war für beide Extrakte der Fall, sodass die Proben nicht weiter vorbehandelt werden mussten. Als organische Phase wurden Ethylacetat, MEK, tert-Butylmethylether (MTBE), n-Octanol und stabilisierter Diethylether verwendet. Die Extraktion erfolgte in 1,5 mL Reaktionsgefäßen. Die Proben wurden gevortext und ruhten bis zur Phasentrennung. Anschließend wurde die organische Phase vorsichtig mit einer Pipette entfernt und die wässrige Phase mittels HPLC auf den Xylose- und Acetatgehalt untersucht.

In einer zweiten Vorversuchsreihe wurde das Hydrolysat-Lösemittel-Verhältnis angepasst. Es wurden 300 μ L Probe und 600 μ L Lösemittel eingesetzt. Es wurden MTBE und n-Octanol als organische Phase getestet. Die Durchführung erfolgte analog zur ersten Versuchsreihe.



Abbildung 3.5: Flüssig-Flüssig-Extraktion nach Durchmischung der organischen und wässrigen Phase.

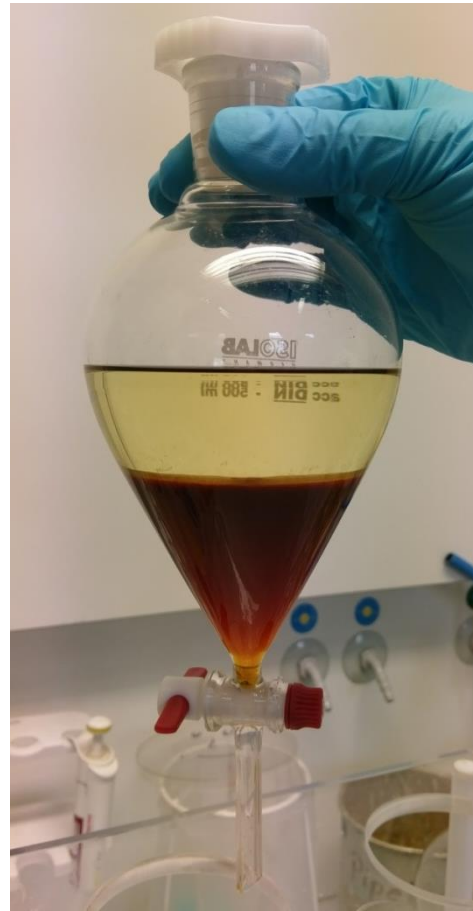


Abbildung 3.6: Flüssig-Flüssig-Extraktion. Phasentrennung nach 15 min Ruhephase.

Zur Detoxifizierung vom Ultrafiltrat- und Nanofiltrat-Hydrolysat im größeren Maßstab wurde MTBE als Extraktionsmittel verwendet. Es wurden 150 mL Hydrolysat mit 200 mL MTBE im Scheidetrichter vermengt und ausgeschüttelt (Abbildung 3.5). Nach der Phasentrennung (Ruhephase für mindestens 15 min; Abbildung 3.6) wurde die wässrige Phase über ein Ablassventil aufgefangen und die organische Phase verworfen. Die Extraktion wurde 4mal wiederholt.

3.7 Einsatz unterschiedlicher Stickstoffquellen

Der Hefeextrakt im Basal-HE-Medium wurde durch die Zugabe von ProtiGrain® (CropEnergies AG, Mannheim, Deutschland) und Rapsextraktionsschrot (Rapsschrot) (Archer Daniels Midland AG, Chicago, USA) substituiert. Um die Reststoffe den Mikroorganismen verfügbar zu machen, mussten diese aufgeschlossen werden. Hierfür wurde eine enzymatische Hydrolyse mit Protex™ 6L (Genencor International, Inc., Rochester, NY, USA) durchgeführt. Die Zusammensetzung des Hydrolyseansatzes sowie die Hydrolysebedingungen sind in Tabelle 3.17 aufgelistet. Die Durchführung erfolgte nach Klotz 2017.

Tabelle 3.17: Zusammensetzung und Hydrolysebedingung der Hydrolyseansätze mit ProtiGrain® und Rapsschrot. Durchführung nach Klotz 2017.

Zusammensetzung / Bedingungen	Ansatz mit ProtiGrain®	Ansatz mit Rapsschrot
Reststoff	20 g	20 g
NaOH (5 mol/kg)	2,4 g	1,5 g
Eingestellter Start-pH-Wert	9,5	9,6
Protex™ 6 L	120 µL	120 µL
Inkubation	60 °C bei 100 rpm im Thermoblock	60 °C bei 100 rpm im Thermoblock
pH-Korrektur auf pH 8 nach 5 h mit NaOH (5 mol/kg)	400 µL	600 µL
Gesamtdauer Inkubation	26 h	26 h

Für den Aufschluss wurden ca. 2 % (w/w) Enzym pro Gramm Protein eingesetzt. Da während des Aufschlusses der pH-Wert sank, wurde dieser nach 5 h mit 5 M NaOH korrigiert, um eine pH-Inhibierung des Enzyms zu vermeiden.

Von dem ProtiGrain®-Hydrolysat wurden dem Medium ca. 19,5 g/L und vom Rapsschrot-Hydrolysat ca. 18 g/L zugefügt, um einen Stickstoffgehalt zu erreichen, der 10 g/L Hefeextrakt entsprach.

3.7.1 Vitaminzusatz

Den Ansätzen mit den hydrolysierten Reststoffen sowie den Ansätzen ohne Hefeextrakt oder reduziertem Hefeextrakt wurden teilweise eine Vitaminlösung zugesetzt. Die Zusammensetzung dieser Lösung ist in Tabelle 3.18. Die Vitamine wurden in einer Stammlösung in 1000facher bzw. Riboflavin und Folsäure in 100facher Konzentration angesetzt und in entsprechender Menge dem Medium zugesetzt.

Tabelle 3.18: Zusammensetzung des Vitaminzusatzes.

Vitamin	Zusatzmenge [µg/L]
Thiamin · HCl	1071
Riboflavin	495
Niacin	9837
Ca-Pantothenat	2370
Pyridoxin · HCl	939
Biotin	18
Folsäure	583
Cyanocobalamin	0,93
Inositol	58445

3.7.2 Aminosäurezusatz

Neben Vitaminen wurden den verschiedenen Ansätzen zur Untersuchung unterschiedlicher Stickstoffquellen auch Aminosäuren zugesetzt. Die Mengen des Zusatzes richteten sich nach den Mengen, die in 10 g/L Hefeextrakt enthalten sind. Asparaginsäure und Serin wurden in doppelter Menge zugesetzt. Die Mengenangaben sind in Tabelle 3.19 dargestellt.

Tabelle 3.19: Zusammensetzung des Aminosäurezusatzes.

Aminosäure	Zusatzmenge [mg/L]
Alanin	400
Arginin	100
Asparagin	170
Asparaginsäure	420
Glutaminsäure	710
Glycin	150
Histidin	50
Isoleucin	230
Leucin	370
Lysin	170
Methionin	50
Phenylalanin	220
Prolin	110
Serin	460
Threonin	170
Tryptophan	50
Tyrosin	80
Valin	280

3.8 Analytische Methoden

3.8.1 Optische Dichte

Das Wachstum der Kulturen wurde mit Hilfe der optischen Dichte (OD) verfolgt. Die Messung erfolgt abhängig der unterschiedlichen Kultivierungssysteme.

Mikrotiterplatte

Zur Bestimmung der OD in 96-Well MTP wurde der Plattenleser ELx808 Absorbance Reader (BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, USA) bei einer Wellenlänge von 595 nm genutzt. Die Bestimmung erfolgte direkt in den Platten, die Proben wurden nicht behandelt.

Schüttelkolben

Die OD wurde mit einem UV/Vis-Spektrometer T80 (PG Instruments, Leicestershire, UK) bei einer Wellenlänge von 600 nm gemessen. Alle Proben wurden mindestens 1:10 mit Reinstwasser verdünnt. Beim Überschreiten einer Maximalen OD von 0,5 wurden die Proben weiter verdünnt. Als Referenz diente Reinstwasser, welches als Blindwert von der gemessenen OD abgezogen wurde.

3.8.2 Biotrockenmasse

Zur Bestimmung der Biotrockenmasse für *B. vallismortis* B-14891 wurde der Umrechnungsfaktor von der optischen Dichte bei 600 nm auf die Biotrockenmasse bestimmt. Hierfür wurde *B. vallismortis* B-14891 in zwei Schüttelkolben (300 mL Kolben mit 3 Schikanen, 60 mL Füllvolumen, 37 °C, 125 rpm) für ca. 20 h kultiviert. Je 40 mL Kulturlösung wurde in 50 mL Schraubröhren überführt und für 15 min bei 10.016 g (Biofuge Stratos, Heraeus Instruments) bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die beiden Pellets vereinigt. Anschließend wurde das Pellet in 40 mL Medium resuspendiert. Von der Zellsuspensionslösung wurden sechs Verdünnungsstufen angefertigt. Von den Verdünnungen wurden Proben genommen, die im UV/Vis-Spektrometer bei einer Wellenlänge 600 nm vermessen wurden. Hierfür wurden die Proben soweit verdünnt, dass eine optische Dichte von 0,5 nicht überschritten wurde.

Zusätzlich wurde 1 mL der verdünnten Zellsuspensionen in 1,5 mL Reaktionsgefäße überführt. Die Reaktionsgefäße wurden zuvor bei 110 °C für 48 h getrocknet und im Exsikkator abgekühlt. Anschließend wurde das Gewicht der Reaktionsgefäße bestimmt. Die Zellsuspensionen in den Reaktionsgefäßen wurden bei 21.100 g für 10 min bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Pellets in Reinstwasser resuspendiert. Die Proben wurden nochmals bei 21.100 g für 10 min bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut verworfen und die Pellets bei 110 °C für mindestens 48 h getrocknet. Die Abkühlung der Proben erfolgte erneut im Exsikkator. Anschließend wurde das Gewicht der Reaktionsgefäße mit Zellpellet bestimmt. Die Biotrockenmasse errechnet sich aus dem Gewicht der getrockneten Reaktionsgefäße mit Zellpellet abzüglich des Leergewichts der Reaktionsgefäße.

Für die ermittelte Biotrockenmasse und optische Dichte wurde ein Korrelationsdiagramm erstellt. Anhand des Korrelationsdiagramms wurde der Umrechnungsfaktor von der optischen Dichte zur Biotrockenmasse ermittelt. Die Biotrockenmasse wurde mit Gleichung 3 berechnet. Das Bestimmtheitsmaß der Korrelation betrug 0,996.

Gleichung 3: Berechnung der Biotrockenmasse (BTM) mithilfe der optischen Dichte.

$$\text{BTM [g/L]} = \text{OD}_{600} \cdot 0,355$$

3.8.3 Online Bestimmung der C-Quellen-Limitierung und dem Kultivierungsende

Zur Ermittlung des Zeitpunktes der C-Quellen-Limitierung wurde die Abgasanalyse GA4 der DASbox® verwendet. Für die Auswertung wurde die Kohlenstoffdioxidtransferrate (CTR = Carbon Transfer Rate) herangezogen. Prinzipiell eignet sich auch die Sauerstofftransferrate (OTR = Oxygen Transfer Rate), durch den geringen Sauerstoffeintrag in den Kultivierungen, lieferte die CTR jedoch das bessere Signal.

In Abbildung 3.7 ist der Verlauf der CTR schematisch dargestellt bei einer Kultivierung in der die Kohlenstoffquelle verbraucht ist und einer Kultivierung, die zum Erliegen kommt ohne dass die Kohlenstoffquelle limitierend ist.

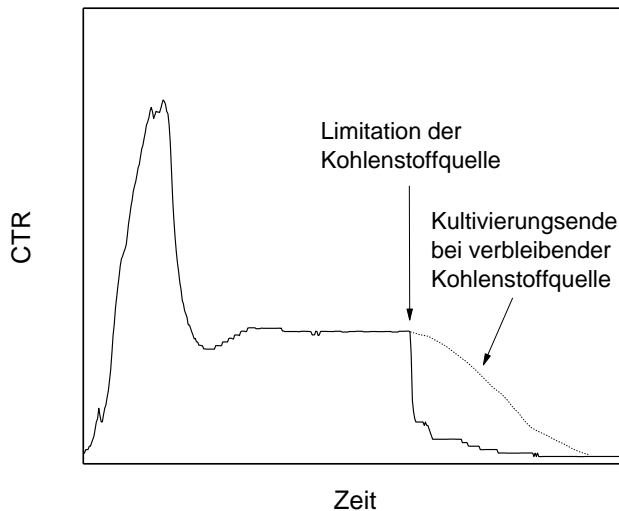


Abbildung 3.7: Schematische Darstellung des online CTR-Verlaufs einer Kultivierung bei der die C-Quelle verbraucht ist (durchgezogene Linie) und einer Kultivierung die zum Erliegen kommt ohne dass die C-Quelle verbraucht ist (gestrichelte Linie).

Bei der Umsetzung von 1 mol Glucose zu 2,3-BDO entstehen 2 mol CO₂ und bei der Nutzung von 1 mol Xylose werden 1,67 mol CO₂ gebildet. Die CTR wird mit Gleichung 4 berechnet. Ist die C-Quelle verbraucht kann kein CO₂ mehr gebildet werden. Der CO₂-Anteil der Zuluft ist dann in etwa gleich zum CO₂-Anteil der Abluft und die CTR nähert sich abrupt dem Nullpunkt. Kommt die Kultivierung zum Erliegen obwohl noch Kohlenstoff zur Verfügung steht, läuft dieser Prozess langsamer ab. Die Kultur verbraucht mit der Zeit immer weniger Kohlenstoff und produziert daher weniger CO₂. Der CTR-Wert nimmt damit ab, bis schließlich der Nullpunkt erreicht wird.

Gleichung 4: Berechnung der Kohlenstoffdioxidtransferrate.

$$CTR = \frac{Q_L M_{CO_2}}{V_L V_N} \cdot \left[X_{CO_2,out} - X_{CO_2,in} \left(\frac{1 - X_{CO_2,in} - X_{O_2,in}}{1 - X_{CO_2,out} - X_{O_2,out}} \right) \right]$$

Q_L	Belüftungsrate [m ³ /h]
V_L	Flüssigkeitsvolumen [m ³]
M_{CO_2}	Molare Masse CO ₂ [g/mol]
V_N	Volumen 1 mol Gas unter Normalbedingungen [22,4116 m ³ /h]
$X_{CO_2,in}$	CO ₂ -Anteil des Zuluftstromes
$X_{CO_2,out}$	CO ₂ -Anteil der Abluft
$X_{O_2,in}$	O ₂ -Anteil des Zuluftstromes
$X_{O_2,out}$	O ₂ -Anteil der Abluft

3.8.4 Voges-Proskauer-Test

Der Voges-Proskauer-Test dient dem Nachweis von Acetoin in Kulturlösungen. Für den Test wurde 1 mL der Kulturbrohe bei 21.100 g für 10 min bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und das Pellet verworfen. Der Überstand wurde mit 0,3 mL Lösung A und 1 mL Lösung B versetzt. Nach einer Inkubationszeit von 10 min wurde ein Farbumschlag optisch ermittelt. Hierfür diente reines Kulturmedium versetzt mit 0,3 mL Lösung A und 1 mL Lösung B als Negativkontrolle und Kulturmedium mit ca. 0,1 % (w/v) Acetoin als Positivkontrolle.

Voges-Proskauer-Reagenzien:

Lösung A: 5% (w/v) 1-Naphtol in 96%igem Ethanol

Lösung B: 40%ige KOH

3.8.5 Aminosäurebestimmung mittels EZ:faast® und Gaschromatographie mit Flammenionisationsdetektor

Freie Aminosäuren im Medium wurden mit dem EZ:faast® GC-FID Physiological, Amino Acid Analysis Kit der Firma Phenomenex (Torrance, CA, USA) bestimmt. Mit Hilfe des Kits wurden die Aminosäuren derivatisiert und in unpolare, leichter flüchtige Verbindungen umgewandelt. Die derivatisierten Proben wurden mittels Gaschromatographie mit Flammenionisationsdetektor (GC-FID) bestimmt. Die Systemspezifikationen sind in Tabelle 3.20 und die Betriebsparameter in Tabelle 3.21 beschrieben.

Für die Derivatisierung der Fermentationsproben wurden diese zunächst 1:10 mit Reinstwasser verdünnt und mit dem internen Standard des Kits versetzt. Mittels des Kits fand weiter eine Festphasenextraktion, Aufreinigung der Aminosäuren und eine Veresterung der Carboxyl- und Aminogruppen statt. Die Durchführung der Derivatisierung erfolgte entsprechend der Herstellerangaben.

Die Kalibrierung des Systems erfolgte mit Standards aus dem Kit, die wie die Proben mittels des Kits derivatisiert und anschließend mit dem GC-FID analysiert wurden.

Tabelle 3.20: GC-FID Systemkomponenten.

Komponente	Modell	Hersteller
GC-MS	GC-17A	Shimadzu, Kyoto, Japan
Autosampler	AOC-20i	Shimadzu, Kyoto, Japan
Säule	Zebtron™ ZB-AAA [10 m x 0,25 mm ID;df = 0,25 µm]	Phenomenex, Torrance, USA

Tabelle 3.21: GC-FID-Methode zur Bestimmung der freien Aminosäuren.

Komponente	Betriebsparameter
Injektionsvolumen	2 µL (wässrige Probe)
Trägergas	H ₂
Lineargeschwindigkeit	53,6 cm/s
Split	1:15
Injektionstemperatur	300 °C
Temperaturprogramm	t ₀ = 110 °C + 20 °C/min auf 250 °C + 10 °C/min auf 320 °C; 1 min halten
Gesamtlaufzeit	15 min
FID-Temperatur	340 °C

3.8.6 Hochdruckflüssigkeitschromatographie

3.8.6.1 Bestimmung von Substraten, Produkten und Nebenprodukten

Die qualitative und quantitative Bestimmung der Substrate, Produkte und Nebenprodukte erfolgte durch eine Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC = High Pressure Liquid Chromatography). Zur Vorbereitung für die HPLC-Messung wurden die Fermentationsproben für 10 Minuten bei 21.100 g bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und mit Reinstwasser verdünnt. Die Verdünnungen richteten sich dabei nach der Substrat- und Produktkonzentration, sodass eine Konzentration von 2 g/L Substanz (linearer Kalibrationsbereich) nicht überschritten wurde. Für die Trennung der Zucker, organischen Säuren und Alkohole wurde eine Aminex HPX-87H Säule (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA) verwendet. Die Trennung der Analyten beruht auf mehreren Wechselwirkungsmechanismen, wie Ionenausschluss, Größenausschluss, Ionenaustausch, Ligandenaustausch und hydrophobe Wechselwirkungen. Als mobile Phase wurde eine 5 mM Schwefelsäure verwendet. In Tabelle 3.22 sind die verwendeten Komponenten aufgelistet und Tabelle 3.23 zeigt die verwendeten Parameter, mit denen die Proben gemessen worden sind.

Tabelle 3.22: Liste der Komponenten des verwendeten HPLC-Systems zur quantitativen Bestimmung der Substrate, Produkte und Nebenprodukte.

Komponente	Modell	Hersteller
Autosampler	Basic Marathon	Spark Holland B.V., Emmen, Niederlande
Entgaser	Degasys DG 1310	Dionex, Gemeringen, Deutschland
Pumpe	HPLC Pump K-1001	Knauer, Berlin, Deutschland
Säulenofen	655A-52	Merck/Hitachi, Darmstadt, Deutschland
Vorsäule	Aminex HPX-87H (50 x 4,6 mm)	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA
Säule	Aminex HPX-87H (300 x 7,8 mm)	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA
Refraction Index (RI)-Detektor	K-2301	Knauer, Berlin, Deutschland
UV-Detektor	SPD-10A	Shimadzu, Kyoto, Japan

Tabelle 3.23: HPLC-Methode zur Bestimmung der Substrate, Produkte und Nebenprodukte.

Betriebsparameter	
Flussrate	0,6 mL; ~ 53 bar
Temperatur Säulenofen	60 °C
Laufmittel	5 mM Schwefelsäure
Injektionsvolumen	20 µL
UV-Wellenlängen	210 nm und 276 nm
Messzeit	30 min

3.8.6.2 Bestimmung von Nebenprodukten in Holz-Hydrolysaten

Die Bestimmung der Nebenprodukte aus Holz-Hydrolysat erfolgte mit einem weiteren HPLC-System (Tabelle 3.24). Mit diesem System war es möglich, die Nebenprodukte aufgrund ihres hydrophoben Charakters, mit einem Acetonitrilgradienten zu eluieren. Die Methode und die Einstellungen des Gradienten sind in Tabelle 3.25 aufgezeigt.

Mit dem System wurden Ameisensäure, Essigsäure, 4-Hydroxybenzoesäure, 5-Hydroxymethylfurfural, Furfural, Syringaldehyd und Vanillin in Konzentrationen von 0,1 - 1,0 g/L kalibriert. Eine quantitative Bestimmung der ausgewählten Substanzen war somit gegeben.

Tabelle 3.24: Liste der Komponenten des verwendeten HPLC-Systems zur Bestimmung der Holz-Hydrolysatnebenprodukte.

Komponente	Modell	Hersteller
Autosampler	AS-AP Autosampler	Dionex, Sunnyvale, USA
Pumpe	Dual Pumpe (quarternäre Niederdruck-Gradientenpumpe)	Dionex, Sunnyvale, USA
Säulenofen	ICS-5000: TC-Modul	Dionex, Sunnyvale, USA
Vorsäule	Carbo-H (Security Guard)	Dionex, Sunnyvale, USA
Säule	HPX-87H	Dionex, Sunnyvale, USA
Detektor	UV: Photodiodenarray-Detektor	Dionex, Sunnyvale, USA

Tabelle 3.25: HPLC-Methode zur Bestimmung der Holz-Hydrolysatnebenprodukte.

Betriebsparameter		
Injektionsvolumen	25 µL	
Flussrate	0,7 mL/min	
Messzeit	70 min	
Temperatur	50 °C	
UV-Messwellenlängen	210, 257, 275, 285, 308 nm	
Gradient	5 mM H ₂ SO ₄ [%]	Acetonitril [%]
Zeit [min]		
0	100	0
4	100	0
5	91,5	8,5
25	91,5	8,5
40	83	17,0
41	100	0
70	100	0

3.8.7 Ionenaustauschchromatographie mit gekoppelter amperometrischer Detektion zur Bestimmung von Monosacchariden

Zur Bestimmung des Monosaccharidgehalts in den Birkenholz-Hemicellulose-Hydrolysaten wurde eine Ionenchromatographie mit gekoppelter amperometrischer Detektion (HPAEC-PAD, High Performance Anion Exchange Chromatography - Pulsed Ampereometric Detection) genutzt. Mit diesem System war eine Trennung und Quantifizierung der Monosaccharide Arabinose, Galactose, Glucose, Rhamnose und Xylose möglich. In Tabelle 3.26 sind die Komponenten des HPAEC-PAD-Systems aufgelistet.

Mit der Methode konnten Monosaccharidgehalte von 1 - 20 mg/L bestimmt werden. Die Proben mussten entsprechend ihres Zuckergehaltes auf den Messbereich verdünnt werden.

Tabelle 3.27 zeigt die Einstellungen der verwendeten HPAEC-PAD-Methode.

Tabelle 3.26: Liste der Komponenten des verwendeten HPAEC-PAD-Systems.

Komponente	Modell	Hersteller
Autosampler	AS-AP Autosampler	Dionex, Sunnyvale, USA
Pumpe	ICS-5000: DP Dual Pumpe, inkl. Degasser	Dionex, Sunnyvale, USA
Säulenofen	ICS-5000: DC Modul	Dionex, Sunnyvale, USA
Vorsäule	Dionex CarboPac PA20: BioLC 3 x 30 mm (Guard)	Dionex, Sunnyvale, USA
Säule	Dionex CarboPac PA20: BioLC 3 x 150 mm (Guard)	Dionex, Sunnyvale, USA
Detektor	ICS-5000: ED amperometrischer Detektor (Au- und pH, Ag/AgCl-Referenzelektrode)	Dionex, Sunnyvale, USA

Tabelle 3.27: HPAEC-PAD-Methode zur Bestimmung der Monosaccharide.

Betriebsparameter				
Injektionsvolumen	10 µL			
Flussrate	0,4 mL/min			
Laufzeit	72 min			
Temperatur	30 °C			
Gradient	Reinstwasser	10 mM NaOH	200 mM NaOH	1 M NaAC + 25 mM NaOH
	[%]	[%]	[%]	[%]
Zeit [min]				
0,0	50	50	0	0
30,0	50	0	50	0
40,0	10	0	50	40
43,0	0	0	10	90
43,5	0	0	100	0
55,0	50	50	0	0
72,0	50	50	0	0

3.8.8 Optische Emissionsspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma

Die Spurenelemente im Fermentationsüberstand sowie die Spurenelemente in den Hydrolysaten wurden mittels optischer Emissionsspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma (ICP-OES) untersucht.

Um alle Spurenelemente messen zu können, mussten die komplexgebundenen Substanzen in eine lösliche Form überführt werden und störende Matrixsubstanzen eliminiert werden. Hierfür wurde zunächst ein Aufschluss der Proben durchgeführt.

Je 2 mL Probe wurde in eine 50 mL Schraubröhre überführt und mittels flüssigen Stickstoffs schockgefroren. Anschließend wurden die gefrorenen Proben in einer Gefriertrocknungsanlage Alpha 1-2 LD (Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Osterode am Harz, Deutschland) für mindestens 70 h lyophilisiert. Für den Aufschluss der getrockneten Proben wurden 6 mL konzentrierte Salpetersäure (65% Suprapur®, Merck, Darmstadt, Deutschland) in die Schraubröhren pipettiert und über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Den Proben wurde anschließend 2 mL Wasserstoffperoxid (30 % Suprapur®, Merck, Darmstadt, Deutschland) zugesetzt und für weitere 10 min inkubiert. Danach wurden die Proben vollständig von den Schraubröhren in Mikrowellenaufschlußvials aus PTFE (CEM GmbH, Kamp-Lintfort, Deutschland) überführt. Der Aufschluss erfolgte in einer Mars Xpress Mikrowelle (CEM GmbH, Kamp-Lintfort, Deutschland). Hierfür wurde ein Temperaturprogramm gewählt, bei dem die Proben zunächst für 15 min auf 190 °C aufgeheizt wurden. Danach wurde die Temperatur von 190 °C für 15 min gehalten. Schließlich erfolgte eine Abkühlung der Proben innerhalb von 15 min. Die aufgeschlossenen Proben wurden von den Mikrowellenaufschlußvials in Messkolben aus PMP überführt und mit Reinstwasser verdünnt (1:12,5 oder 1:50).

Tabelle 3.28: Bedingungen der ICP-OES-Messung.

Parameter	Messbedingung im UV- und VIS-Bereich
Plasmaleistung	UV: 1350 W Vis: 1150 W
Spülgas	Stickstoff 5,0
Plasmagas	Argon 4,8
Zerstäubergasstrom	UV: 0,50 L/min Vis: 0,65 L/min
Hilfsgasstrom	0,5 L/min
Spülpumprate	50 U/min
Analysenpumprate	50 U/min
Stabilisierungszeit	5 s

Die Bestimmung der aufgeschlossenen und verdünnten Proben erfolgte mit einer iCAP 6300 Duo-Anlage der Firma Thermo Fisher Scientific, Inc. (Sunnyvale, USA). Im vorliegenden

Argonplasma werden die einzelnen Elemente energetisch angeregt. Dabei kommt es zu einer elementspezifischen Strahlungsemission, die mit einer CCD-Kamera erfasst wird. In Tabelle 3.28 sind die Einstellungen der Messungen und in Tabelle 3.29 sind die verwendeten Wellenlängen und Messmodi der gemessenen Elemente dargestellt.

Tabelle 3.29: Wellenlängen und Messmodi der verwendeten ICP-OES-Methode.

Element	Wellenlänge [nm]	Messmodus
Ag	328,068	axial
Al	396,152	radial
As	189,042	axial
B	249,773	axial
Ba	455,403	radial
Be	234,861	radial
Bi	223,061	axial
Ca	422,673	radial
Cd	214,438	axial
Co	228,616	axial
Cr	267,716	axial
Cu	324,754	axial
Fe	259,940	axial
K	766,490	radial
Li	670,784	radial
Mg	280,270	radial
Mn	293,930	axial
Mo	202,030	axial
Na	589,592	radial
Ni	231,604	axial
P	177,495	axial
Pb	220,353	axial
S	182,034	axial
Sb	217,581	axial
Se	203,985	axial
Sr	407,771	radial
Ti	337,280	axial
Tl	190,856	axial
V	292,464	axial
Zn	206,200	axial

Für die Quantifizierung der Elemente wurde die Methode mit einem 28 Mehrelementstandard und zusätzlichem Schwefel- und Phosphorstandard (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) kalibriert. Hierfür wurden Verdünnungen in den Stufen

0,01, 0,05, 0,1, 0,5, 1,0, 5,0 und 10,0 mg/L sowie ein Blank angefertigt. Die Standards und der Blank wurden in derselben Matrix angesetzt wie die zu messenden Proben.

3.8.9 Ionenchromatographie

Die gelösten Salze der Fermentationsproben wurden mittels Ionenchromatographie (IC) bestimmt. Hierfür wurden zwei Dionex®-Systeme ICS-1000 von Thermo Fisher Scientific, Inc. (Sunnyvale, CA, USA) genutzt. Ein System diente der Bestimmung von Kationen, das Andere der Anionenbestimmung. Beide Systeme wurden durch einen Autosampler mit Probe bedient. Mit diesem Doppelsystem konnten Anionen und Kationen simultan aus einer Probe bestimmt werden. Die Systemkomponenten und die IC-Methoden sind in Tabelle 3.30 aufgelistet.

Zur Kalibrierung des Systems wurde ein Anionen- und Kationenmehrelementstandard für die IC (Thermo Fisher Scientific, Inc., Sunnyvale, CA, USA) verwendet.

Tabelle 3.30: IC-Systemkomponenten und Methoden zur Bestimmung von Anionen und Kationen.

Komponente/ Betriebsparameter	Anionen-IC	Kationen-IC
Vorsäule	Dionex® IonPac AG11-HC 4 x 50 mm	Dionex® IonPac CG16 5 x 50 mm
Säule	Dionex® IonPac AS11-HC 250 x 4 mm	Dionex® IonPac CS16 250 x 5 mm
Temperatur	RT	60 °C
Eluent	25 mM NaOH	36 mM Methansulfonsäure
Flussrate	1 mL/min	1 mL/min
Injektionsvolumen	25 µL	25 µL
Suppressor	ASRS 300 (4 mm)	CSRS 300 (4 mm)
Suppressorstrom	62 mA	106 mA

3.8.10 Gaschromatographie zur Bestimmung der 2,3-Butandiol-Stereoisomere

Die Stereoisomere der bakteriell gebildeten 2,3-BDO-Moleküle wurden mittels Gaschromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung (GC-MS) bestimmt. Hierfür wurde ein Gerät der Firma Shimadzu Corp. (Kyoto, Japan) verwendet. Zur Trennung der Isomere wurde eine Säule mit einer permethylierten Cyclodextrin-Beschichtung verwendet. Die Säule eignet sich unter anderem zur Trennung chiraler Säuren, Alkohole und Diole. Die Gerätespezifikationen sind in Tabelle 3.31 und die Betriebsparameter in Tabelle 3.32 aufgezeigt.

Tabelle 3.31: GC-MS Systemkomponenten.

Komponente	Modell	Hersteller
GC-MS	QP2010 SE	Shimadzu Corp., Kyoto, Japan
Autosampler	AOC-20i	Shimadzu Corp., Kyoto, Japan
Säule	ChiralDEX B-PM [30 m x 0,25 mm ID; df = 0,25 µm]	Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA

Tabelle 3.32: GC-MS-Methode zur Bestimmung der 2,3-BDO-Stereoisomere.

Betriebsparameter	
Injektionsvolumen	0,5 µL (wässrige Probe)
Trärgas	Helium
Split	1:100
Injektionstemperatur	250 °C
Linear Geschwindigkeit	26 cm/sec
Temperaturprogramm	t ₀ = 60 °C für 1 min + 5 °C/min auf 130 °C, Haltezeit 5 min
Gesamtlaufzeit	20 min
Temperatur Ionenquelle	200 °C
Temperatur Interface	200 °C
Solvent Cut Time	7 min
Zeitprogramm	7 - 9 min; Scan [40 - 200 m/z] 9,75 - 13,75 min; SIM [45; 43; 57 m/z] 13,75 - 20 min; Scan [40 - 200 m/z]

4 Ergebnisse und Diskussion

4.1 Primäres Screening

Für das Screening von Bakterien mit bestimmten Eigenschaften wurden zwei Vorgehensweisen durchgeführt: die Auswahl von Bakterien aufgrund ihrer phylogenetischen Abstammung (Kapitel 4.1.1) und die Isolierung von Bakterien aus Umweltproben (Kapitel 4.1.2).

4.1.1 Phylogenetisches Screening

Der Bezug von Mikroorganismen aus Stammsammlungen ist eine der wichtigsten Quellen von wirtschaftlich nutzbaren Mikroorganismen. Um eine geeignete Auswahl zu treffen ist es wichtig, sich mit der Literatur vertraut zu machen und geeignete Rahmenparameter zu definieren. Für diese Arbeit sollten Mikroorganismen gescreent werden:

- I) die nicht humanpathogen sind (Risikoklasse-1-Mikroorganismen)
- II) die Xylose und andere Substrate aus lignocellulosehaltigem Material oder agrarischen Reststoffen verwerten können
- III) die nach Möglichkeit bei Temperaturen von 50 °C wachsen und 2,3-BDO produzieren können, um einen „Simultaneous Saccharification and Fermentation“ (SSF)-Prozess zu ermöglichen

Die derzeit höchste 2,3-BDO-Endkonzentration mit einem Risikoklasse-1-Mikroorganismus, wurde mit dem Stamm *Bacillus licheniformis* DSM 8785 (Jurchescu et al. 2013) erreicht. Dieser Stamm wurde daher als Referenzstamm für das Screening ausgewählt. *B. licheniformis*-Stämme zeichnen sich durch ein Wachstum bei Temperaturen bis zu 55 °C, eine hohe Produktivität und hohe 2,3-BDO-Endkonzentrationen aus (Li et al. 2013b, Li et al. 2014). Für das Screening wurden neben dem Referenzstamm zwei weitere *B. licheniformis*-Stämme getestet.

Weitere literaturbekannte 2,3-BDO-Produzenten, die hohe Endtiter erreichen sind *Paenibacillus polymyxa* und *Bacillus amyloliquefaciens* (Häßler et al. 2012, Yang et al. 2013). Mit *B. amyloliquefaciens* wurden mit den Substraten Glucose und Glycerin hohe 2,3-BDO-Konzentrationen erreicht (Yang et al. 2011, Yang et al. 2013). Für das Screening wurden zwei *Bacillus amyloliquefaciens*-Stämme zur Untersuchung ausgewählt.

In der Literatur finden sich viele Artikel über den Mikroorganismus *P. polymyxa* als 2,3-BDO-Produzent. Dieser Stamm zeichnet sich durch ein breites Substratspektrum aus, der bevorzugt die optisch aktive D-(-)-2,3-BDO-Form produziert (De Mas 1987, Hespell 1996,

Häßler et al. 2012). Aufgrund der guten Ergebnisse, die mit diesem Genus bereits erzielt werden konnten, wurden vier *P. Polymyxa*-Stämme für das Screening ausgewählt. Dabei ist der Stamm B-510 ein literaturbekannter guter 2,3-BDO-Produzent (Hespell 1996).

Auch von *B. subtilis* sind Veröffentlichungen zur 2,3-BDO Produktion verfügbar (Fu et al. 2014, Fu et al. 2016, Moes et al. 1985, Nakano et al. 1997, López und Fortnagel 1972). *B. subtilis* gilt als Modellstamm aus dem Genus *Bacillus*. Für das Screening wurden zwei *B. subtilis*-Stämme ausgewählt.

Neben den bekannten Stämmen wurden 3 phylogenetisch nah verwandte Stämme zu *B. licheniformis*, *B. amyloliquefaciens* und *B. subtilis* bezogen. Die Stämme *B. atrophaeus*, *B. mojavensis* und *B. vallismortis* sind am nächsten mit den Stämmen *B. amyloliquefaciens* und *B. subtilis* verwandt. Die *Bacillus*-Stämme sind nur durch wenige phänotypische Merkmale zu unterscheiden. *B. mojavensis* unterscheidet sich nur in der Fettsäurezusammensetzung und *B. atrophaeus* durch seine Pigmentierung von *B. subtilis*. *B. subtilis* unterscheidet sich wiederum von *B. amyloliquefaciens* in lediglich drei phylogenetischen Merkmalen und vom weiter entfernten Verwandten *B. licheniformis* durch fünf Merkmale (Roberts et al. 1996). Für das Screening wurde je ein *B. atrophaeus*-, *B. mojavensis*- und *B. vallismortis*-Stamm bezogen.

Literaturrecherchen weisen darauf hin, dass auch *Geobacillus*-Stämme für die Produktion von 2,3-BDO in Frage kommen (Xiao et al. 2012, Giovannini et al. 2008). *Geobacillus*-Stämme wurden lange dem Genus *Bacillus* zugeordnet. Dort bildeten sie die von Ash et al. 1991 eingeführte Gruppe V. Erst 2001 wurden die Stämme in den Genus *Geobacillus* transferiert (Nazina et al. 2001). Die *Geobacillus*-Stämme weisen die größte genetische Abweichung zu dem Referenzstamm *B. licheniformis* auf. Sie sind thermophil und wachsen zwischen Kultivierungstemperaturen von 55 °C und 75 °C. Dieser Temperaturbereich ist für industrielle Zwecke gut geeignet, da das Kulturmedium bei hohen Kultivierungstemperaturen nicht mehr sterilisiert werden muss, die Prozesskosten sinken und Potential zur Verbesserung der Produktivität und der Prozesseffizienz besteht. Zusätzlich sind Temperaturen zwischen 50 – 60 °C vorteilhaft für einen SSF-Prozess, da viele Cellulasen und Xylanasen in diesem Temperaturbereich ihr Aktivitätsoptimum aufweisen (Farinas et al. 2010, Li et al. 2014, Öhgren et al. 2007). Über die Effizienz als 2,3-BDO-Produzenten ist nur wenig bekannt. Derzeit liegt die maximal erreichte 2,3-BDO-Konzentration von einem *Geobacillus*-Stamm bei 18,3 g/L (Giovannini et al. 2008). Für das Screening wurden drei *Geobacillus*-Stämme ausgewählt.

Für das Screening wurden somit Bakterien des Genus *Bacillus* und *Bacillus*-ähnliche ausgewählt und von den Stammsammlungen DSMZ (Deutsche Stammsammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen) und NRRL (Northern Regional Research Laboratory) bezogen. Tabelle 4.1 zeigt eine Auflistung der ausgewählten Stämme.

Tabelle 4.1: Auswahl von Bakterien aufgrund ihrer phylogenetischen Abstammung.

Stamm	Zusatz
<i>Geobacillus kaustophilus</i>	NRS-81
<i>Geobacillus stearothermophilus</i>	NRS-64
<i>Geobacillus thermoglucosidasius</i>	B-14516
<i>Bacillus atrophaeus</i>	NRS-213
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	DSM 7
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	NRS-762
<i>Bacillus licheniformis</i>	DSM 8785
<i>Bacillus licheniformis</i>	B-23318
<i>Bacillus licheniformis</i>	B-14209
<i>Bacillus mojavensis</i>	B-14698
<i>Bacillus subtilis</i>	B-571
<i>Bacillus subtilis inaquosorum</i>	B-23056
<i>Bacillus vallismortis</i>	B-14891
<i>Paenibacillus polymyxa</i>	DSM 356
<i>Paenibacillus polymyxa</i>	B-369
<i>Paenibacillus polymyxa</i>	B-510
<i>Paenibacillus polymyxa</i>	B-719

4.1.1.1 Medienwahl

Zu Beginn des primären Screenings wurde zunächst ein geeignetes Kultivierungsmedium bestimmt. Hierfür wurden drei Medien miteinander verglichen, die in der Literatur für die 2,3-BDO-Produktion eingesetzt worden sind. Das Basal-Medium wurde 1998 von Nakashimada et al. für die Kultivierung eines *P. polymyxa*-Stammes verwendet. Für die Kultivierung von *B. licheniformis* nutzte Perego et al. 2003 das Defined-Medium und Li et al. 2013b das MRS-Medium. Mit diesen Medien wurden jeweils gute 2,3-BDO-Endkonzentrationen, Ausbeuten und/oder Produktivitäten erreicht. Die Medien wurden stellvertretend mit den Stämmen *B. licheniformis* DSM 8785, *B. amyloliquefaciens* DSM 7 und *P. polymyxa* DSM 356, hinsichtlich ihrer Eignung als Screeningmedium, getestet. Die Vorkultur wurde jeweils im Basal-Medium mit 20 g/L Glucose durchgeführt.

In Abbildung 4.1 sind die Kultivierungsergebnisse von *B. licheniformis* DSM 8785 in den drei verschiedenen Medien dargestellt. Unter der Verwendung des Basal- und Defined-Mediums wies der Stamm eine lag-Phase von etwa 2 h auf. Der Glucoseverbrauch zwischen 2 h und 4 h lag mit beiden Medien im selben Bereich zwischen 5,6 g/(L·h) und 5,9 g/(L·h). Innerhalb der folgenden 2 h (zwischen 4 h und 6 h Kultivierung) stieg der Glucoseverbrauch im Basal Medium auf 10,4 g/(L·h) und im Defined-Medium auf 7,9 g/(L·h). Die Glucose war im Basal Medium nach 8 h und im Defined-Medium nach 10 h vollständig verbraucht. Bei der Kultivierung mit dem MRS-Medium verlängerte sich die lag-Phase von 2 h auf etwa 4 h. Anschließend wurde die Glucose schnell verwertet mit einem maximalen Verbrauch von 14,5 g/(L·h). Die Glucose war mit dem MRS-Medium nach 10 h fast vollständig verstoff-

wechselt. Mit allen drei Medien wurden etwa dieselben Endkonzentrationen von 20 – 24 g/L 2,3-BDO und Acetoin gebildet. Die Konzentrationen an Acetoin und 2,3-BDO werden zusammenaddiert, da es sich um eine reversible Reaktion handelt und gebildetes 2,3-BDO, abhängig von den Kultivierungsbedingungen, zu Acetoin zurückgebildet werden kann (vergl. Kapitel 2.1.3). Wenn nicht anders beschrieben, wird im Folgenden die Konzentration von 2,3-BDO + Acetoin als Produkt bezeichnet.

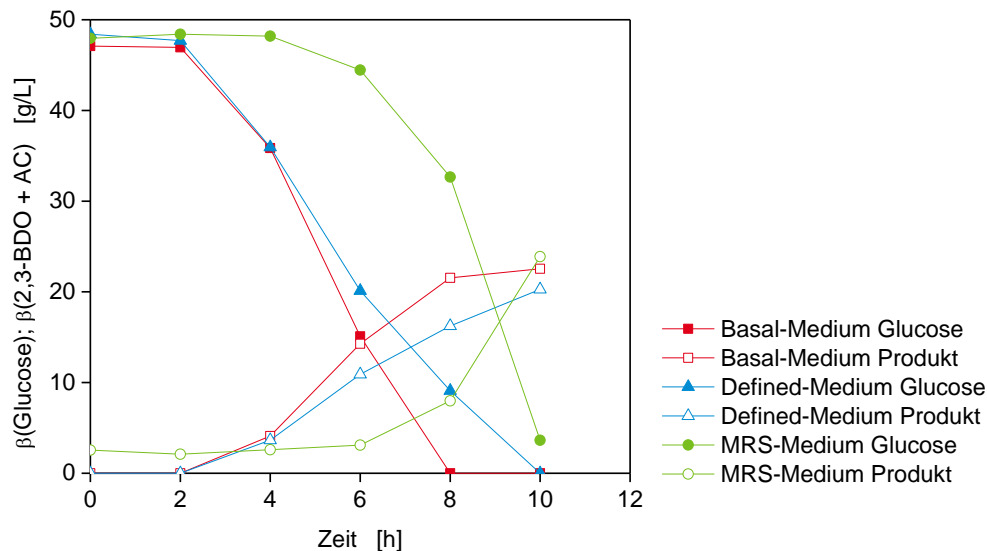


Abbildung 4.1: Glucoseverbrauch und Produktbildung von *B. licheniformis* DSM 8785 in Basal-, Defined- und MRS-Medium. Kultivierung im Schüttelkolben mit 3 Schikanen mit einem Füllvolumen von 60 mL bei 50 °C und 125 rpm.

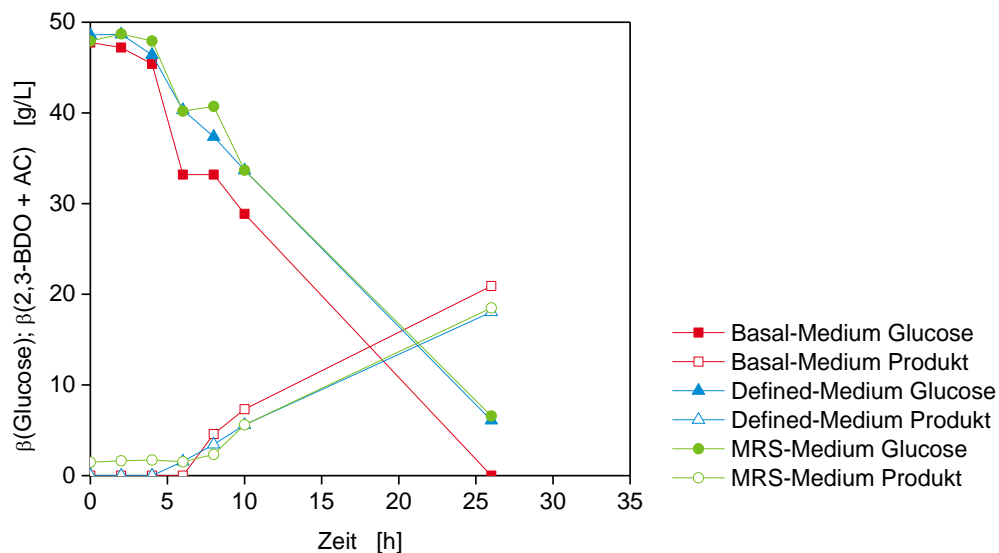


Abbildung 4.2: Glucoseverbrauch und Produktbildung von *B. amyloliquefaciens* DSM 7 in Basal-, Defined- und MRS-Medium. Kultivierung im Schüttelkolben mit 3 Schikanen mit einem Füllvolumen von 50 mL bei 37 °C und 100 rpm.

Bei *B. amyloliquefaciens* DSM 7 betrug die lag-Phase in den drei Kultivierungsmedien 3 – 4 h (Abbildung 4.2). Im MRS- und Defined-Medium wurde die Glucose anschließend mit einer

Rate von ungefähr 1,8 g/(L·h) und im Basal Medium mit 2,1 g/(L·h) verbraucht. Nach 26 h war der Zucker im Basal-Medium verbraucht und im Defined- und MRS-Medium waren jeweils noch 6 g/L Glucose enthalten. Die Produktbildung unterschied sich in den drei Medien geringfügig. Es wurden 18,1 g/L (Defined-Medium), 18,5 g/L (MRS-Medium) und 20,9 g/L (Basal-Medium) 2,3-BDO und Acetoin gebildet.

P. polymyxa DSM 356 wies im Basal Medium die kürzeste und im MRS-Medium die längste lag-Phase auf (Abbildung 4.3). Im Basal Medium wurde die Glucose zwischen 4 und 8 h mit einer Rate von 6,1 g/(L·h) verwertet. Nach 24 h war in allen drei Medien die Glucose vollständig verbraucht und es wurden zwischen 17,9 g/L und 20,1 g/L Produkt gebildet.

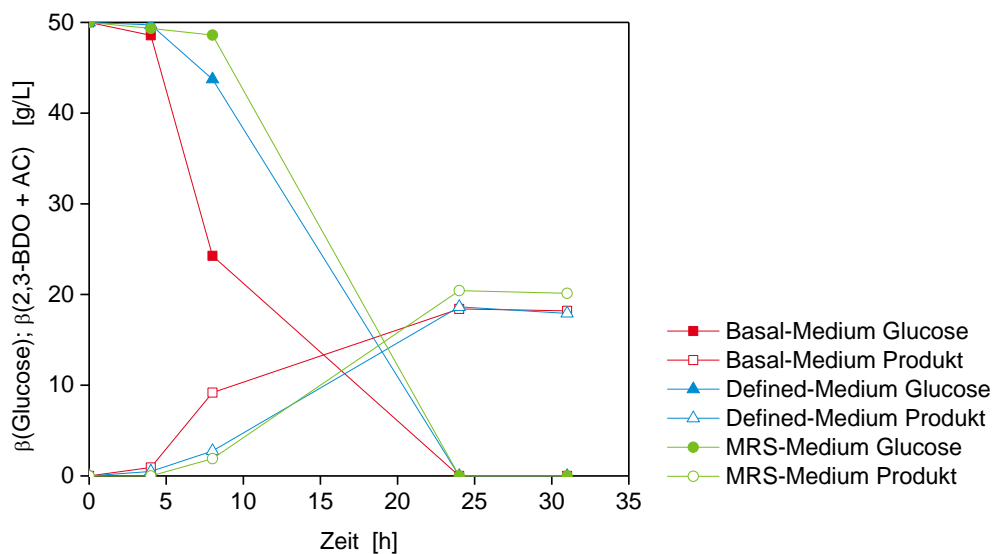


Abbildung 4.3: Glucoseverbrauch und Produktbildung von *P. polymyxa* DSM 356 in Basal-, Defined- und MRS-Medium. Kultivierung in 96-Well MTP mit einem Füllvolumen von 200 µL bei 37,5 °C und 800 rpm.

Im Basal-Medium konnten die drei Stämme die Glucose jeweils am schnellsten verwerten. *B. licheniformis* DSM 8785 und *P. polymyxa* DSM 356 wiesen zudem im Basal-Medium eine kürzere lag-Phase auf als im MRS- und Defined-Medium. Die längeren lag-Phasen können jedoch auch dadurch verursacht worden sein, dass das Vorkulturmedium nicht dem Hauptkulturmedium entsprach. In der Produktbildung unterschieden sich die drei Stämme, in den drei Medien kaum. Alle drei Medien sind somit prinzipiell für die 2,3-BDO-Kultivierung geeignet. Aufgrund der kürzeren lag-Phasen von *B. licheniformis* DSM 8785 und *P. polymyxa* DSM 356 im Basal-Medium, wurde dieses Medium für das Screening ausgewählt.

Im Basal-Medium sind die Komplexbestandteile Hefeextrakt und Pepton zu jeweils 5 g/L enthalten. Aufgrund geringerer Produktkosten sollte das Pepton durch Hefeextrakt ersetzt werden. Zudem erleichtert der Einsatz nur eines Komplexbestandteils die spätere Medienanalyse und -optimierung. Mit dem Referenzstamm *B. licheniformis* DSM 8785 wurde der Einfluss dieser Substitution stellvertretend untersucht (Abbildung 4.4).

Der Glucoseverbrauch, das Wachstum und die Produktbildung unterschieden sich in den Kultivierungen mit Basal- und Basal-HE-Medium kaum. Die Substitution des Komplexbestandteils Pepton durch Hefeextrakt wurde als erfolgreich eingestuft. Das Basal-HE-Medium wurde für alle Kultivierungen im Screening verwendet.

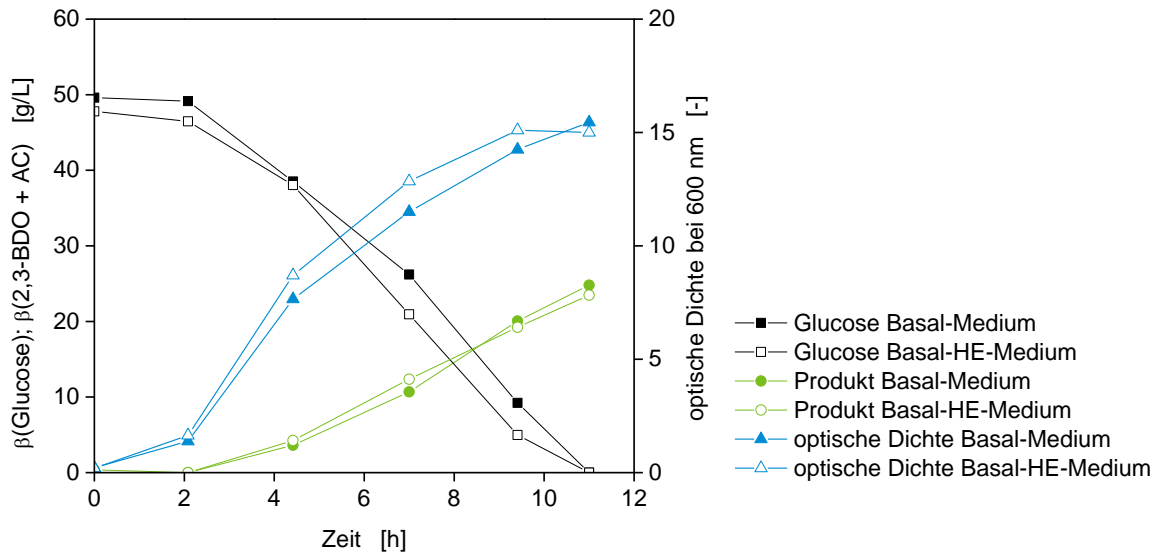


Abbildung 4.4: Kultivierung von *B. licheniformis* DSM 8785 in Basal (ausgefüllte Zeichen) und Basal-HE-Medium (leere Zeichen). Vergleich des Glucoseverbrauchs (Rechteck), der Produktbildung (Kreis) und der optischen Dichte bei 600 nm (Dreieck). Kultivierung im Schüttelkolben mit 3 Schikanen mit einem Füllvolumen von 60 mL bei 50 °C und 125 rpm.

4.1.1.2 Charakterisierung der phylogenetischen Screening-Stämme

Der erste Screeningversuch der 17 Stämme wurde in 300 mL Schüttelkolben mit drei Schikanen mit 60 mL Basal-HE-Medium und 50 g/L Glucose (Tabelle 4.2) bzw. 50 g/L Xylose (Tabelle 4.3) durchgeführt. Bei der Umwandlung von Pentosen (Xylose) zu 2,3-BDO entstehen mehr organische Säuren als bei der Umwandlung von Hexosen (Marwoto et al. 2004). Durch die Bildung der organischen Säuren sinkt der pH-Wert während der Kultivierung und hemmt den weiteren Kultivierungsverlauf. Um zu verhindern, dass der pH-Wert abnimmt und die Kulturen inhibiert werden, wurde das Medium mit dem Substrat Xylose zusätzlich mit 0,15 M Phosphatpuffer versetzt und auf einen pH-Wert von $6,6 \pm 0,1$ eingestellt. Die Schüttelfrequenzen und Temperaturen, bei denen die einzelnen Stämme kultiviert wurden, sind in Tabelle 4.2 und Tabelle 4.3 angegeben. Die Kultivierungstemperaturen wurden aus den Kultivierungsbedingungen der jeweiligen Stammdatenbank abgeleitet oder in Vorversuchen bestimmt. Bewertet wurden die Substratverwertung sowie die 2,3-BDO- und Acetoinproduktion.

Tabelle 4.2: 2,3-BDO- und Acetoinbildung mit 50 g/L Glucose als einzige Kohlenstoffquelle der nach dem phylogenetischen Abstammungsverhältnis ausgewählten Stämme. Kultivierung mit Basal-HE-Medium im 300 mL Schüttelkolben mit 3 Schikanen, einem Füllvolumen von 60 mL, einer Schüttelfrequenz von 125 rpm und einem Start-pH-Wert von $6,6 \pm 0,1$.

Stamm	Zusatz	Temperatur [° C]	Zeit [h]	Glucose- verwertung [%]	2,3- BDO [g/L]	Acetoin [g/L]	End-pH- Wert [-]
<i>B. licheniformis</i> *	DSM 8785	45 °C	11	100	21,0	2,5	6,2
<i>G. kaustophilus</i>	NRS-81	55°C	24	27	0	0	5,2
<i>G. stearothermophilus</i>	NRS-64	55°C	24	12	0	0	4,8
<i>G. thermoglucosidasius</i>	B-14516	55°C	24	2	0	0	6,5
<i>B. atrophaeus</i>	NRS-213	39 °C	24	100	0	25,4	6,5
<i>B. amyloliquefaciens</i>	DSM 7	37 °C	20	81	11,5	4,7	5,0
<i>B. amyloliquefaciens</i>	NRS-762	39 °C	24	51	2,4	1,0	4,9
<i>B. licheniformis</i>	B-23318	45 °C	11	92	20,7	0	6,3
<i>B. licheniformis</i>	B-14209	45 °C	11	50	4,9	6,2	5,8
<i>B. mojavensis</i>	B-14698	39 °C	24	91	7,7	14,0	4,9
<i>B. subtilis</i>	B-571	39 °C	24	59	1,1	11,8	5,0
<i>B. subtilis inaquosorum</i>	B-23056	39 °C	24	100	3,5	22,9	5,3
<i>B. vallismortis</i>	B-14891	39 °C	11	72	10,1	1,7	4,3
<i>P. polymyxa</i>	B-369	39 °C	24	74	5,6	10,9	6,0
<i>P. polymyxa</i>	B-510	39 °C	24	96	13,1	8,3	4,9
<i>P. polymyxa</i>	B-719	39 °C	24	48	3,0	6,4	4,8
<i>P. polymyxa</i>	DSM 356	39 °C	24	100	14,5	9,6	5,2

* Referenzstamm für das durchgeführte Screening

In Tabelle 4.2 ist die Verwertung von Glucose mit den getesteten Stämmen dargestellt. Bis auf die *Geobacillus*-Stämme konnten alle Stämme die Glucose zu 2,3-BDO und/oder zu Acetoin umsetzen.

Der Referenzstamm erzielte die schnellste Glucoseumsetzung und höchste 2,3-BDO Produktion. Die 2,3-BDO- und Acetoinausbeute lag bei 0,49 g/g und die Produktivität bei 2,1 g/(L·h). *B. licheniformis* B-23318 erzielte vergleichbare Ergebnisse wie der Referenzstamm und zeigte ebenfalls einen schnellen Glucoseumsatz und eine gute 2,3-BDO-Produktion. Die Produktausbeute lag bei 0,52 g/g und die Produktivität bei 1,9 g/(L·h). Die maximale theoretische Ausbeute von Glucose zu 2,3-BDO liegt bei 0,5 g/g. Eine Ausbeute über den maximalen theoretischen Wert deutet auf eine Verdunstung hin. Im Screening erfolgte kein Verdunstungsausgleich. Der Stamm *B. licheniformis* B-14209 setzte innerhalb von 11 h nur etwa die Hälfte der Glucose um. Im Vergleich zu den weiteren getesteten Stämmen ist dies eine gute Umsetzungsrate, im Vergleich zu den *B. licheniformis*-Stämmen war es hingegen eine geringe Umsetzung mit einer Produktausbeute von 0,50 g/g und einer Produktivität von 1,0 g/(L·h). Die *B. licheniformis*-Stämme zeichneten sich allgemein durch einen schnellen Substratumsatz aus. Dies wird unter anderem durch die höhere Kultivierungstemperatur bedingt.

P. polymyxa DSM 356 und B-510 produzierten nach den *B. licheniformis*-Stämmen am meisten Produkt (2,3-BDO + Acetoin). Die Ausbeuten lagen bei 0,48 g/g und 0,43 g/g. Die Umsetzung der Glucose erfolgte etwa mit der halben Geschwindigkeit bezogen auf die Umsetzung des Referenzstammes. Daraus errechnen sich Produktivitäten von 1,0 g/(L·h) und 0,9 g/(L·h). Die Temperatur 39 °C wird für diesen Stamm als optimal beschrieben. Bei höheren Temperaturen (> 42 °C) wird der Stamm inaktiviert (Marwoto 2002). Eine Produktivitätssteigerung durch eine Temperaturerhöhung kann daher nicht erfolgen. Der Stamm B-719 erreichte von den *P. polymyxa*-Stämmen die geringste Produktbildung.

B. vallismortis B-14891 erzielte bei 39 °C gute Umsetzungsraten. Der Stamm verbrauchte innerhalb von 11 h 72 % der Glucose und setzte diese mit einer Produktausbeute von 0,37 g/g um. Für *B. vallismortis* B-14891, *B. atrophaeus* NRS-213 und *B. mojavensis* B-14698 war die maximale Kultivierungstemperatur nicht bekannt. Diese Stämme wurden daher bei einer mittleren Temperatur von 39 °C kultiviert. Die Umsetzungsrate lässt sich mit einer Erhöhung der Temperatur eventuell noch steigern.

Die Stämme *B. atrophaeus* NRS-213, *B. mojavensis* B-14698, *B. subtilis* B-571, *B. subtilis inaquosorum* B-20365 und *P. polymyxa* B-369 produzierten im Verhältnis deutlich mehr Acetoin als 2,3-BDO. In der Literatur wird beschrieben, dass sich das Acetoin-2,3-BDO-Verhältnis durch eine Änderung der Kultivierungsparameter beeinflussen lässt (Moes et al. 1985). Die Stämme *B. subtilis inaquosorum* B-20365 und *B. atrophaeus* NRS-213 konnten die Glucose innerhalb von 24 h vollständig verwerten und setzten diese nahezu vollständig zu Acetoin um. In diesem Fall könnte gebildetes 2,3-BDO auch zu Acetoin rückgebildet worden sein (vergl. Kapitel 2.1.3). Hierfür spricht auch, dass *B. atrophaeus* NRS-213 nach 8 h Kultivierung und einem Glucoseumsatz von 38,9 % das Produkt in einem Verhältnis von 1,6 g/L Acetoin zu 6,5 g/L 2,3-BDO gebildet hatte.

Bei der Kultivierung im ersten Screeningdurchlauf fällt auf, dass der End-pH-Wert im Basal-HE-Medium für 11 der 17 Stämme auf einen pH-Wert unter 5,5 sinkt. Für eine gute 2,3-BDO-Produktion wird ein pH-Wert zwischen 5,5 und 7,0 als optimal beschrieben (vergl. Kapitel 2.1.4). Sinkt der pH-Wert unter 5,5 ist eine Inhibierung der Kultivierung und/oder der Produktbildung möglich. Das Absinken wird durch die Bildung organischer Säuren verursacht und deutet auf eine vermehrte Nebenproduktbildung hin. Für Stämme bei denen der pH-Wert absinkt, ist der 2,3-BDO-Stoffwechselweg eventuell nicht der Hauptstoffwechselweg oder die Kultivierungsparameter waren zur Bildung von 2,3-BDO ungeeignet. Zur Bewertung der Produktbildung der Stämme müssen die Versuche mit einem stärker gepufferten Medium wiederholt werden.

Die Konversion von Xylose zu 2,3-BDO fiel insgesamt geringer aus als mit Glucose (Tabelle 4.3). Die *Geobacillus*-Stämme, *B. subtilis* B-571 und *B. amyloliquefaciens* DSM 7 waren nicht in der Lage, Xylose zu 2,3-BDO oder Acetoin umzusetzen. Die Stämme *B. mojavensis* B-14698, *P. polymyxa* B-369 und B-719 setzten innerhalb von 24 h etwa dieselbe Menge an Xylose um wie zuvor an Glucose. Bei *B. mojavensis* B-14698 und *P. polymyxa* B-369 war die Produktbildung mit Xylose geringer. Bei dem Stamm *P. polymyxa* B-719 wirkte sich das

Substrat Xylose positiv auf das 2,3-BDO-Acetoin-Verhältnis aus. Die Gesamtproduktmenge blieb bei diesem Stamm in etwa gleich.

Tabelle 4.3: 2,3-BDO- und Acetoinbildung mit 50 g/L Xylose als einzige Kohlenstoffquelle der nach dem phylogenetischen Abstammungsverhältnis ausgewählten Stämme. Kultivierung Basal-HE-Medium mit 0,15 M Phosphatpuffer im 300 mL Schüttelkolben mit 3 Schikanen, einem Füllvolumen von 60 mL, einer Schüttelfrequenz von 125 rpm und einem Start-pH-Wert von $6,6 \pm 0,1$.

Stamm	Zusatz	Temperatur [° C]	Zeit [h]	Xylose- Verwertung [%]	2,3- BDO [g/L]	Acetoin [g/L]	End-pH- Wert [-]
<i>B. licheniformis</i> *	DSM 8785	45 °C	23	42	1,0	1,8	4,9
<i>G. kaustophilus</i>	NRS-81	55°C	24	11	-	-	5,8
<i>G. stearothermophilus</i>	NRS-64	55°C	24	8	-	-	5,8
<i>G. thermoglucosidasius</i>	B-14516	55°C	24	10	-	-	5,8
<i>B. atrophaeus</i>	NRS-213	39 °C	24	78	4,6	3,9	5,9
<i>B. amyloliquefaciens</i>	DSM 7	37 °C	49	4	-	-	6,4
<i>B. amyloliquefaciens</i>	NRS-762	39 °C	24	64	5,9	2,4	6,2
<i>B. licheniformis</i>	B-23318	45 °C	23	54	3,7	4,2	6,1
<i>B. licheniformis</i>	B-14209	45 °C	23	35	0,7	2,8	5,1
<i>B. mojavensis</i>	B-14698	39 °C	24	86	7,2	4,2	5,8
<i>B. subtilis</i>	B-571	39 °C	24	6	-	-	7,2
<i>B. subtilis inaquosorum</i>	B-23056	39 °C	24	72	4,8	3,0	5,9
<i>B. vallismortis</i>	B-14891	39 °C	11	60	5,2	1,7	4,3
<i>P. polymyxa</i>	B-369	39 °C	24	87	11,2	4,0	6,2
<i>P. polymyxa</i>	B-510	39 °C	24	64	3,7	6,9	5,0
<i>P. polymyxa</i>	B-719	39 °C	24	45	2,5	3,1	4,8
<i>P. polymyxa</i>	DSM 356	39 °C	24	51	2,5	5,5	4,9

* Referenzstamm für das durchgeführte Screening

Die *B. licheniformis*-Stämme erzielten mit Glucose die besten Ergebnisse. Mit Xylose als einzige Kohlenstoffquelle, lagen die Umsätze im Mittelfeld und die Produktbildungen waren mit am geringsten. Die höchsten Produktmengen unter den *B. licheniformis*-Stämmen bildete der Stamm B-23318. Der pH-Wert sank bei den Stämmen DSM 8785 und B-14209 mehr als mit dem Substrat Glucose. Die Kultivierungen könnten pH-inhibiert gewesen sein.

P. polymyxa B-369 erzielte mit Xylose als Kohlenstoffquelle die höchsten Produktkonzentrationen. Die Ausbeute sank, verglichen mit der Kultivierung mit Glucose, von 0,43 g/g auf 0,34 g/g. Der pH-Wert sank von 6,6 auf 6,2. Die geringe Versäuerung zeigt, dass der Hauptteil des Kohlenstoffs in den 2,3-BDO-Stoffwechselweg geschleust wurde. Die *P. polymyxa* Stämme B-510, B-719 und DSM 356 verwerteten weniger Substrat und säuerten das Medium dabei stärker an als der Stamm B-369. Hier kann eine pH-Inhibierung die geringe Produktbildung verursacht haben.

Der Stamm *B. vallismortis* B-14891 verwertete die Xylose am schnellsten. 60 % der Xylose waren bereits nach 11 h verbraucht. Die Produktbildung war geringer als mit Glucose. Mit beiden Substraten säuerte der Stamm das Medium am meisten an. Eine gewisse Menge

Kohlenstoff wird demnach für andere Stoffwechselwege verwendet, wodurch der Anteil an Kohlenstoff, der in den 2,3-BDO-Stoffwechselweg gelangt, verringert wird. Dies kann ein Hinweis darauf sein, dass sich der Stamm nicht für die 2,3-BDO-Produktion eignet oder die Kultivierungsbedingungen ungünstig waren.

Die *Geobacillus*-Stämme konnten im Basal-HE-Medium wachsen, verwerteten die Substrate jedoch nur zu geringen Mengen. Zudem wurde kein Produkt gebildet. Dieses Ergebnis kann auf ungünstige Kultivierungsbedingungen hinweisen. Durch Mikroskopaufnahmen konnte bei allen drei Kultivierungen ein Wachstum nachgewiesen werden (Aufnahmen nicht gezeigt). Die Bestimmung der optischen Dichte war im Falle von *G. stearothermophilus* NRS-64 aufgrund einer Pelletbildung nicht möglich. Für die Evaluierung der 2,3-BDO-Produktion der *Geobacillus*-Stämme wurden weitere Untersuchungen durchgeführt. *G. kaustophilus* NRS-81 und *G. stearothermophilus* NRS-64 wurden in Nutrient-Medium mit 20 g/L Glucose und 20 g/L Xylose kultiviert. *G. thermoglucosidasius* B-14516 wurde in *B. thermoglucosidasius*-Medium mit 25 g/L Glucose und 25 g/L Xylose kultiviert. Zudem wurden alle drei Stämme in MS-Medium nach Xiao et al. 2012 mit 25 g/L Glucose und 25 g/L Xylose kultiviert. *G. thermoglucosidasius* B-14516 und *G. stearothermophilus* NRS-64 zeigten kein Wachstum im MS-Medium. In allen weiteren Kultivierungen konnte ein Wachstum der Stämme festgestellt werden. In keinem Ansatz wurden die Zucker verwertet oder Produkt gebildet (Daten nicht dargestellt). Das Wachstum fand demnach auf den Komplexbestandteilen der Medien statt. Die *Geobacillus*-Stämme wurden als ungeeignet für die Umsetzung von Glucose oder Xylose zu 2,3-BDO eingestuft.

Im Screeningdurchlauf mit Xylose säuerten 6 der 17 Stämme das Medium auf unter pH 5,5 an. *B. amyloliquefaciens* NRS-762 und *B. mojavensis* B-14698 verbrauchten in etwa dieselben Mengen an Substrat, wobei der pH-Wert bei der Glucosekultivierung stärker absank. Die Pufferkapazität war in den Kultivierungen mit *B. amyloliquefaciens* NRS-762 und *B. mojavensis* B-14698 ausreichend. Für die weiteren Stämme sank der pH-Wert unter 5,5. Das gewählte Puffersystem war für das Screening ungeeignet.

Die *Geobacillus*-Stämme konnten in den Vorversuchen nicht in Kultur gebracht werden und sind daher an dieser Stelle ungeeignet für die weiteren Versuche. *B. amyloliquefaciens*-, *B. licheniformis*-, *B. subtilis*- und *P. polymyxa*-Stämme werden in der Literatur als 2,3-BDO-Produzenten beschrieben und sind prinzipiell zur 2,3-BDO-Produktion geeignet. Anhand der durchgeführten Vorversuche, sind Stammunterschiede zu erkennen. Die Stämme *B. atrophaeus* NRS-213, *B. mojavensis* B-14698 und *B. vallismortis* B-14891 wurden nach ihrem phylogenetischen Verwandtschaftsgrad für das Screening ausgewählt. Für diese Stämme gibt es bisher keinen Literaturnachweis über eine gute 2,3-BDO-Produktion. Die Voruntersuchungen zeigen, dass alle drei Stämme in der Lage sind mit den Substraten Produkt zu bilden.

4.1.1.3 Bestimmung der maximalen Kultivierungstemperatur

Für die gescreenten Stämme *B. atrophaeus* NRS-213, *B. mojavensis* B-14698, *B. subtilis* B-571, *B. subtilis inaquosorum* B-23056 und *B. vallismortis* B-14891 gibt es derzeit keine oder nur wenige Literaturangaben zu den optimalen Kultivierungsbedingungen für die 2,3-BDO-Produktion. Daher wurde für diese Stämme zunächst eine Versuchsreihe zur Bestimmung der maximalen Kultivierungstemperatur durchgeführt. Es wurden die Temperaturen 37 °C, 39 °C, 41 °C, 45 °C und 50 °C untersucht.

Für *B. atrophaeus* NRS-213 liegt die optimale Kultivierungstemperatur um 41 °C (Abbildung 4.5). Der Stamm erreichte einen Glucosevollumsatz bei 39 °C und 41 °C. Den höchsten Xyloseumsatz erreichte der Stamm bei 41 °C. Die Xylose wurde bei allen Temperaturen nur zu geringen Mengen (< 50 %) verwertet. Die Umsetzung ist jedoch vergleichbar mit den Vorversuchen im Schüttelkolben. In beiden Kultivierungen lag der Xyloseverbrauch bei etwa 40 g/L. Die Umsetzungsrate ist mit Glucose höher als mit Xylose. Die optische Dichte erreichte mit beiden Substraten ein Maximum bei 39 °C. Bei geringeren oder höheren Temperaturen ließ das Wachstum nach. Die Produktausbeuten pro Gramm Glucose bzw. Xylose nehmen von 37 °C auf 41 °C leicht zu. Ab Temperaturen ≥ 45 °C wird der Stamm deutlich gehemmt.

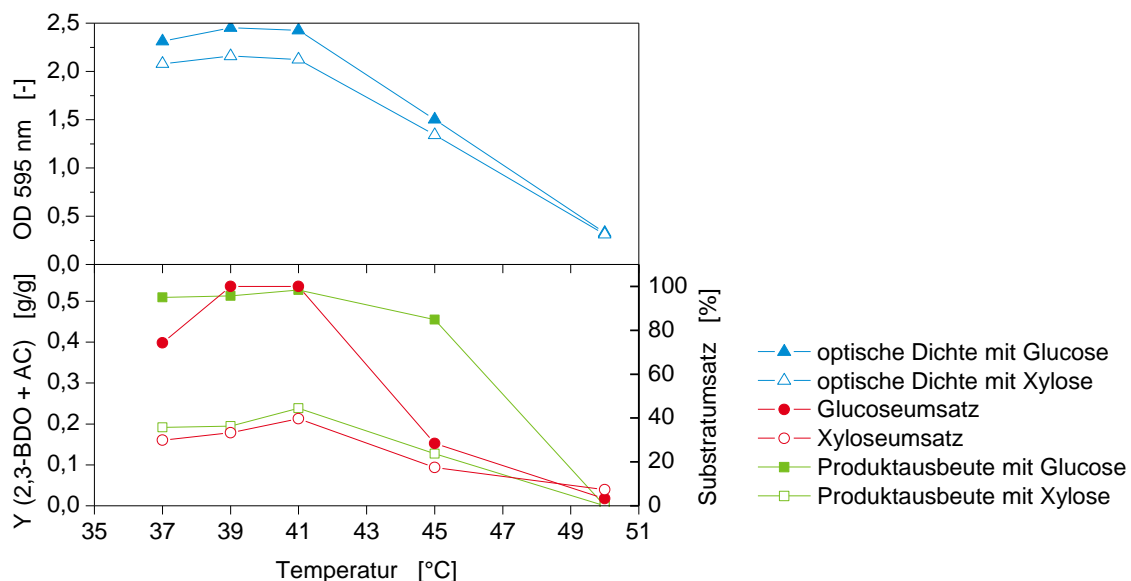


Abbildung 4.5: *B. atrophaeus* NRS-213: Einfluss unterschiedlicher Temperaturen auf den Substratverbrauch (Kreis), die 2,3-BDO- und Acetoin-Ausbeute (Rechteck) und die optische Dichte (Dreieck). Kultivierung in 96-Well Mikrotiterplatten mit 100 g/L Glucose (gefüllte Zeichen) bzw. Xylose (leere Zeichen) bei einer Schüttelfrequenz von 700 rpm.

B. mojavensis B-14698 weist eine breite Temperaturtoleranz auf (Abbildung 4.6). Der Glucoseumsatz war bei 37 °C am geringsten und stieg mit zunehmender Temperatur auf einen Umsatz von 100 %. Bei 50 °C lag der Substratumsatz leicht unter 100 %. Im gesamten Temperaturbereich lag die Ausbeute an 2,3-BDO und Acetoin mit Glucose konstant um 0,5 g/g. Die OD war über den gesamten Bereich konstant zwischen 2,1 und 2,4. Mit zunehmender Temperatur ist ein leicht abnehmender Trend der OD erkennbar. Mit Xylose als einzige Kohlenstoffquelle ist dieser Trend deutlicher. Die OD sank von 2,3 bei 41 °C auf 1,6 bei 50 °C. Mit dem Substrat Xylose ist ein Temperaturoptimum bei 41 °C zu erkennen. Bei dieser Temperatur war der Xyloseumsatz, die optische Dichte und die 2,3-BDO- und Acetoinausbeute am höchsten. Der Stamm erzielt für Glucose sehr gute und für Xylose gute Ergebnisse. Das Wachstum und die Produktbildung bei Temperaturen um 50 °C machen diesen Stamm zu einem potentiellen Kandidaten für einen SSF-Prozess.

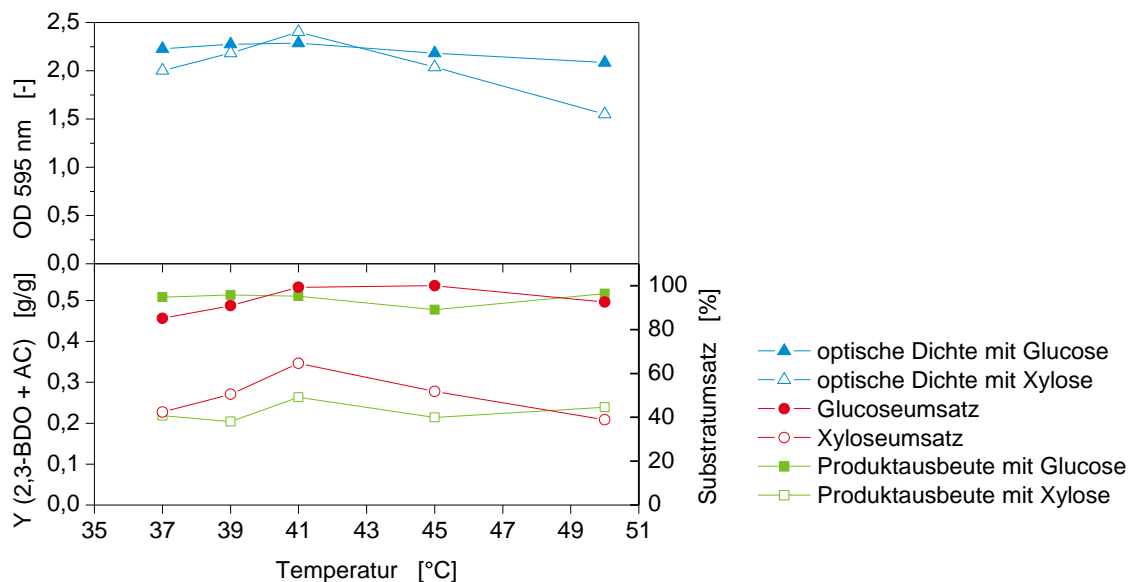


Abbildung 4.6: *B. mojavensis* B-14698: Einfluss unterschiedlicher Temperaturen auf den Substratverbrauch (Kreis), die 2,3-BDO- und Acetoin-Ausbeute (Rechteck) und die optische Dichte (Dreieck). Kultivierung in 96-Well Mikrotiterplatten mit 100 g/L Glucose (gefüllte Zeichen) bzw. Xylose (leere Zeichen) und einer Schüttelfrequenz von 700 rpm.

Die maximale OD von *B. subtilis* B-571 wurde bei der Kultivierung mit Glucose bei 39 °C und mit Xylose bei 41 °C erreicht (Abbildung 4.7). Die optimale Wachstumstemperatur für *B. subtilis* B-571 liegt um 41 °C. Die Substratumsatzungen lagen bei allen Ansätzen unter 25 % und konnten mit einer Temperaturänderung nicht gesteigert werden. Die Produktausbeute mit Glucose lag in dem Temperaturbereich von 37 °C bis 41 °C bei 0,35 – 0,4 g/g. Der genutzte Kohlenstoff ging somit zu 70 – 80 % in den 2,3-BDO-Stoffwechselweg. Mit Xylose wurde so gut wie kein Produkt gebildet. Die geringen Substratumsatzungen sind ein Zeichen für ungünstige Kultivierungsbedingungen, unabhängig von der Temperatur.

Ergebnisse und Diskussion

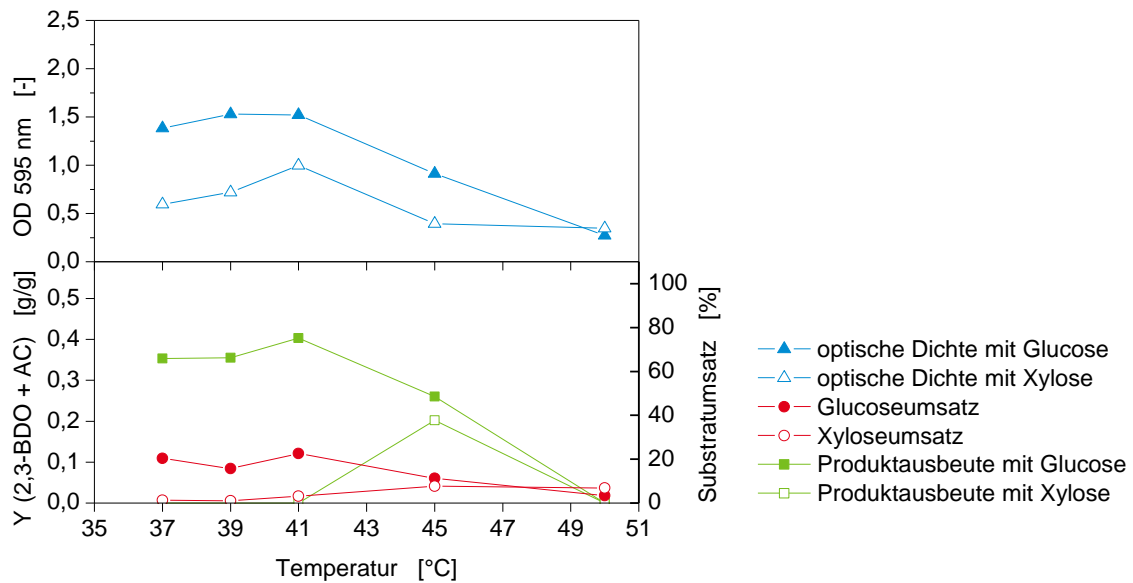


Abbildung 4.7: *B. subtilis* B-571: Einfluss unterschiedlicher Temperaturen auf den Substratverbrauch (Kreis), die 2,3-BDO- und Acetoin-Ausbeute (Rechteck) und die optische Dichte (Dreieck). Kultivierung in 96-Well Mikrotiterplatten mit 100 g/L Glucose (gefüllte Zeichen) bzw. Xylose (leere Zeichen) und einer Schüttelfrequenz von 700 rpm.

Der Stamm *B. subtilis inaquosorum* B-23056 weist eine gute Glucoseumsetzung im Temperaturbereich zwischen 37 °C und 45 °C auf (Abbildung 4.8). Die 2,3-BDO- und Acetoinausbeute liegt über den gesamten Bereich zwischen 0,47 und etwa 0,50 g/g. Bei der Temperaturerhöhung von 45 auf 50 °C sank der Glucoseumsatz um 84 % und die Produktausbeute auf 0,33 g/g. Mit dem Substrat Xylose ist ein Temperaturoptimum in Bezug auf den Umsatz bei 41 °C zu erkennen. Die Produktausbeute liegt über den gesamten Temperaturbereich zwischen 0,1 g/g und 0,2 g/g. Die Produktausbeute mit Xylose ist insgesamt geringer als mit Glucose. Der genutzte Kohlenstoff der Xylose scheint überwiegend in den Biomasseaufbau zu fließen, da auch kaum eine Nebenproduktbildung stattfand. In allen Kultivierungen konnte kein Acetat, Lactat oder Ethanol nachgewiesen werden. Es entstanden aber geringe Mengen (< 2,0 g/L) Formiat und Succinat. *B. subtilis inaquosorum* B-23056 ist ebenfalls in der Lage, bei Temperaturen über 40 °C zu wachsen und 2,3-BDO zu produzieren und kommt daher für einen SSF-Prozess in Frage.

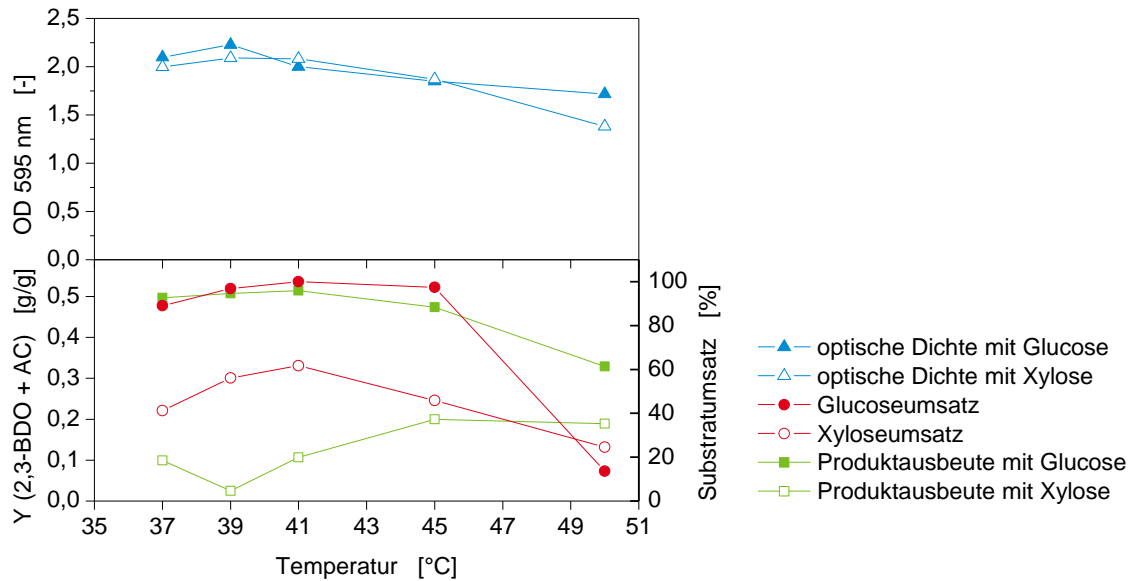


Abbildung 4.8: *B. subtilis inaquosorum* B-23056: Einfluss unterschiedlicher Temperaturen auf den Substratverbrauch (Kreis), die 2,3-BDO- und Acetoin-Ausbeute (Rechteck) und die optische Dichte (Dreieck). Kultivierung in 96-Well Mikrotiterplatten mit 100 g/L Glucose (gefüllte Zeichen) bzw. Xylose (leere Zeichen) und einer Schüttelfrequenz von 700 rpm.

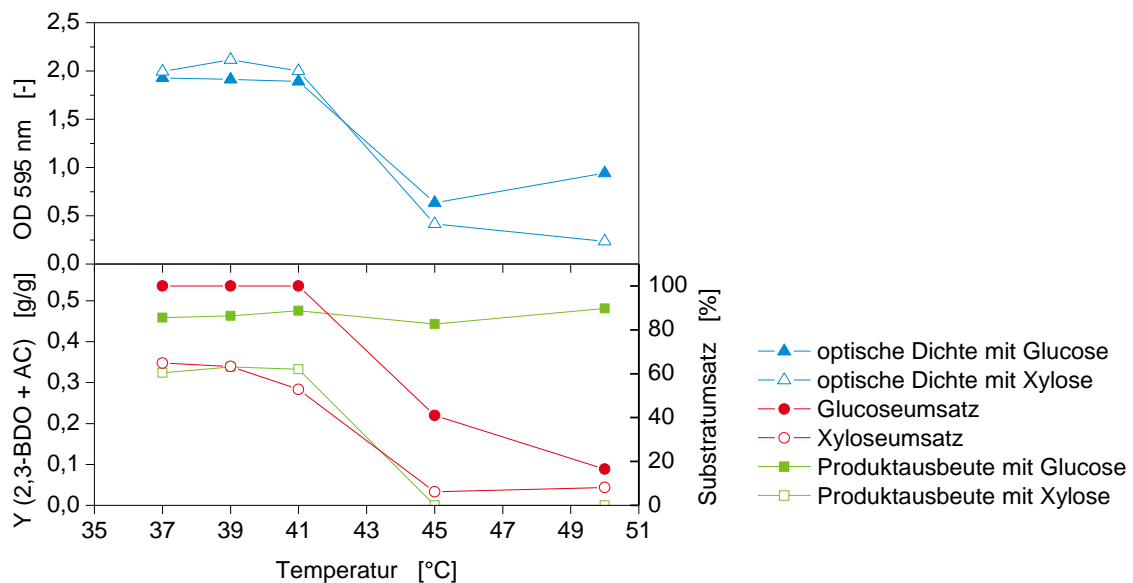


Abbildung 4.9: *B. vallismortis* B-14891: Einfluss unterschiedlicher Temperaturen auf den Substratumsatz (Kreis), die 2,3-BDO und Acetoin Ausbeute (Rechteck) und die optische Dichte (Dreieck). Kultivierung in 96-Well Mikrotiterplatten mit 100 g/L Glucose (gefüllte Zeichen) bzw. Xylose (leere Zeichen) und einer Schüttelfrequenz von 700 rpm.

Für *B. vallismortis* B-14891 sind Temperaturen zwischen 37 °C und 41 °C für eine Kultivierung gut geeignet (Abbildung 4.9). In diesem Temperaturbereich wurde die Glucose innerhalb von 16 h vollständig verwertet und mit einer Ausbeute von 0,46 – 0,48 g/g zu 2,3-BDO und Acetoin umgewandelt. Bei einer Temperaturerhöhung bis auf 50 °C sank der Glucoseumsatz auf etwa 20 % bei gleichbleibender Produktausbeute. Die Xylose wurde bis zu einer Temperatur von 41 °C zu 55 – 60 % mit einer Produktausbeute von 0,32 – 0,34 g/g umgesetzt. Von den getesteten Stämmen in dieser Versuchsreihe konnte *B. vallismortis* B-14891 die Xylose am besten zu 2,3-BDO und Acetoin umsetzen. Bei Temperaturen über 41 °C kann der Stamm keine Xylose mehr verwerten.

4.1.1.4 Bestimmung der 2,3-Butandiol-Stereoisomere

Für die unbekannten 2,3-BDO-Produzenten *B. atrophaeus* NRS-213, *B. mojavensis* B-14698, *B. subtilis inaquosorum* B-23056 und *B. vallismortis* B-14891 wurde untersucht, welche 2,3-BDO-Stereoisomere gebildet werden. Zusätzlich wurden die 2,3-BDO-Stereoisomere der verschiedenen *B. licheniformis*- und *P. polymyxa*-Stämmen bestimmt (Tabelle 4.4). Die D(-)- und L(+)-2,3-BDO-Isomere wurden mittels Gaschromatographie-Massenspektroskopie (GC/MS) identifiziert. Die Stereoisomerbestimmung erfolgte zum Zeitpunkt der maximalen 2,3-BDO-Bildung und bevor eine Substratlimitierung eintrat. Das Verhältnis der Stereoisomere kann sich im Laufe einer Kultivierung verändern (Okonkwo et al. 2017). Die Daten spiegeln somit nur den Trend der Stereoisomerbildung zum Zeitpunkt der Probenahme wider.

Es sind keine Risikoklasse-1-Stämme bekannt, die das L(+)-2,3-BDO-Stereoisomer bilden können (Ji et al. 2011). Die neuen Stämme aus dem phylogenetischen Screening, *B. atrophaeus* NRS-213, *B. mojavensis* B-14698 und *B. vallismortis* B-14891, sind Stämme der Risikoklasse 1 und ebenfalls nicht in der Lage, das L(+)-2,3-BDO-Stereoisomer zu bilden (Tabelle 4.4). Die Stämme unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Stereoisomerbildung. *B. atrophaeus* NRS-213 produziert überwiegend D(-)-2,3-BDO, in einem Verhältnis von 9:1 (D(-)- zu meso-2,3-BDO). *B. mojavensis* B-14698 produziert das D(-)-2,3-BDO Isomer in einem Verhältnis von 8:2 (D(-)- zu meso-2,3-BDO). *B. vallismortis* B-14891 produziert meso- zu D(-)-2,3-BDO in einem Verhältnis von 99:1. Die *P. polymyxa*-Stämme produzieren, wie auch in der Literatur beschrieben, überwiegend D(-)-2,3-BDO. *B. licheniformis* DSM 8785 und B-23318 produzieren überwiegend meso-2,3-BDO in einem Verhältnis von 73:27 und 64:36 (meso- zu D(-)-2,3-BDO).

Tabelle 4.4: Bestimmung der 2,3-BDO-Stereoisomere verschiedener Stämme mittels GC/MS.

Stamm	Zusatz	MS-Flächen- verhältnis	MS-Flächen- verhältnis	MS-Flächen- verhältnis
		L(+)-2,3-BDO [%]	D(-)-2,3-BDO [%]	meso-2,3-BDO [%]
<i>B. atrophaeus</i>	NRS-213	-	88	12
<i>B. amyloliquefaciens</i>	NRS-762	-	100	-
<i>B. licheniformis</i>	DSM 8785	-	27	73
<i>B. licheniformis</i>	B-23318	-	36	64
<i>B. mojavensis</i>	B-14698	-	79	21
<i>B. subtilis</i>	B-23056	-	92	8
<i>inaquosorum</i>				
<i>B. vallismortis</i>	B-14891	-	1	99
<i>P. polymyxa</i>	DSM 356	-	100	-
<i>P. polymyxa</i>	B-369	-	94	6
<i>P. polymyxa</i>	B-510	-	99	1

B. amyloliquefaciens NRS-762 produziert zu 100 % D(-)-2,3-BDO. Der Stamm DSM 7 wurde nicht mittels GC-MS untersucht, aber HPLC-Untersuchungen zeigten, dass dieser Stamm kein meso-2,3-BDO produziert. Von Alam et al. 1990 wird beschrieben, dass mit dem Stamm *B. amyloliquefaciens* DSM 7 (DSM 7 \triangleq ATCC 23350) ein Gemisch aus D(-)- und meso-2,3-BDO gebildet wird. Dieses Ergebnis konnte in dieser Arbeit nicht bestätigt werden.

B. subtilis produziert laut Literatur ein Gemisch aus D(-)- und meso-2,3-BDO (Ji et al. 2011). Für *B. subtilis* B-571 konnte mit HPLC-Analysen ermittelt werden, dass dieser Stamm erst zum Ende der Fermentation geringe Mengen meso-2,3-BDO bildet. *B. subtilis inaquosorum* B-23056 produziert überwiegend D(-)-2,3-BDO jedoch mit einem höheren meso-2,3-BDO-Anteil (etwa 9:1) als *B. subtilis* B-571.

4.1.2 Screening aus natürlichen Umweltproben

Im Anschluss an das Screening nach der phylogenetischen Abstammung, erfolgte ein Screening nach thermophilen 2,3-BDO-Produzenten aus natürlichen Umweltproben. Das Screening wurde als Selektionsprozess aufgebaut. Insgesamt wurden 4 Selektionsschritte durchgeführt, mit denen die Anzahl der Stämme reduziert wurde:

- I) Wachstum bei 50 °C
- II) Voges-Proskauer-Test
- III) Verwertung von Xylose
- IV) Nachweis einer 2,3-BDO-Produktion

Im ersten Schritt wurden Boden-, Kompost- und Erdnussschalenprobe verdünnt und auf Agarplatten ausgestrichen. Die Platten wurden für 20 – 24 h bei 50 °C in anaeroben

Behältern inkubiert. Die anaeroben Bedingungen sollten die Selektion fördern, da der Stoffwechselweg zur 2,3-BDO-Produktion unter sauerstofflimitierten Bedingungen eingeschlagen wird. Die Inkubationstemperatur von 50 °C wurde ausgewählt, um thermophile Bakterien zu selektieren. Zusätzlich hat die hohe Temperatur einen positiven Effekt auf die Selektion von Risikogruppe-1-Mikroorganismen. Humanpathogene Keime (Risikoklasse-2-Mikroorganismen) sind in der Regel mesophil. Auch für die 2,3-BDO-Produzenten der Gattung *Klebsiella* und *Enterobacter* ist ein Wachstum bei hohen Temperaturen nicht bekannt (Esener et al. 1981, Perego et al. 2000). Im ersten Selektionsschritt wurden 226 Kolonien von den Platten isoliert.

In der zweiten Screeningstufe wurden die Kolonien mit dem Voges-Proskauer-Test auf die Bildung von Acetoin geprüft. Für diesen Test wurden die Kolonien zuvor einzeln in 96-Well MTP in Nutrient-Medium mit 20 g/L Glucose bei 50 °C für 20 – 24 h kultiviert. Durch die Zugabe von Kaliumhydroxid und α -Naphthol färbt sich das Kultivierungsmedium rot, wenn das Intermediat Acetoin des 2,3-BDO-Stoffwechselwegs gebildet wurde. Einhundert Kolonien der getesteten 226 Proben waren positiv.

In Schritt 3 wurde die Verwertung von Xylose nachgewiesen. Insgesamt 40 der 100 getesteten Kolonien wurden positiv auf die Xyloseverwertung getestet und im Selektionsschritt 4 auf die Bildung von 2,3-BDO untersucht.

Für den letzten Screeningschritt wurden die 40 Kolonien in Basal-HE-Medium mit 100 g/L Glucose in 96-Well MTP für 20-24 h kultiviert. Anschließend wurde der 2,3-BDO-Gehalt mittels HPLC-Analyse bestimmt. In den ersten Selektionsschritten wurde das gewünschte Endprodukt nicht oder nur indirekt bestimmt. Der vierte Schritt des Screenings war daher eine Überprüfung des Screeningverfahrens in dem falsch-positive Stämme ausselektiert wurden. Insgesamt 31 der 40 Stämme waren in der Lage, 2,3-BDO zu produzieren.

Die einzelnen Ergebnisse der Stämme in jedem Selektionsschritt wurden bewertet, angefangen mit der 2,3-BDO-Produktion und anschließend das Wachstum auf Xylose und Glucose. Aus den 31 identifizierten 2,3-BDO-Produzenten wurden 4 Isolate ausgewählt, die als potentiell interessante 2,3-BDO-Produzenten eingestuft wurden. Die Stämme tragen die internen Namen GB 1, LB 10, B 1-7 und GK 16. Die Stämme GB 1, LB 10 und B 1-7 stammen aus Bodenproben, der Stamm GK 16 wurde aus einer Kompostprobe isoliert.

In Zusammenarbeit mit der DSMZ wurden die Screening-Stämme identifiziert und charakterisiert (Abbildung A 1 bis Abbildung A 4). Alle Isolate sind Bakterien der Risikoklasse 1. Der Stamm GB 1 wurde anhand einer partiellen Sequenzierung der 16 SrDNA zu 99,9 % den Stämmen *B. subtilis* und *Bacillus tequilensis* zugeordnet. Zusätzliche phänotypische Tests weisen auf den Stamm *B. subtilis* hin. Die partielle Sequenzierung für den Stamm GK 16 ergab eine Ähnlichkeit von 99,1 % zu den Stämmen *B. licheniformis* und *B. sonorensis*. Die phänotypischen Tests weisen auf eine *B. licheniformis* ssp. hin. Für die Stämme LB 10 und B 1-7 ergab die partielle Sequenzierung eine Ähnlichkeit von 99,9 % zu dem Stamm *B. licheniformis*. Phänotypische Tests bestätigen dieses Ergebnis. Die beiden Stämme

unterscheiden sich in der Isomerbildung von 2,3-BDO (Tabelle 4.5). Der Stamm *B. licheniformis* LB 10 produziert D(-)- zu meso-2,3-BDO in einem Verhältnis von etwa 9:1. Der Stamm *B. licheniformis* B 1-7 bildet die Isomere in einem Verhältnis von etwa 2:7. Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass es Stammunterschiede gibt. Der Referenzstamm *B. licheniformis* DSM 8785 produziert überwiegend meso-2,3-BDO in einem Verhältnis D(-)- zu meso-2,3-BDO von 2:8.

Tabelle 4.5: Stammzuordnung und Charakterisierung der Eigenisolate GB 1, LB 10, B 1-7 und GK 16.

Interner Name	Stammzuordnung	Risikoklasse	MS-Flächen- verhältnis D(-)-2,3-BDO [%]	MS-Flächen- verhältnis Meso-2,3-BDO [%]
GB 1	<i>B. subtilis</i>	1	92	8
LB 10	<i>B. licheniformis</i>	1	89	11
B 1-7	<i>B. licheniformis</i>	1	24	76
GK 16	<i>B. licheniformis</i>	1	39	61
DSM 8785*	<i>B. licheniformis</i>	1	27	73

* Referenzstamm

Bei den vier gescreenten Isolaten handelt es sich um drei *B. licheniformis*-Stämme und einen *B. subtilis*-Stamm. Die Leistung der vier Isolate wurde in einem Vergleichsexperiment mit dem Referenzstamm *B. licheniformis* DSM 8785 bewertet (Abbildung 4.10).

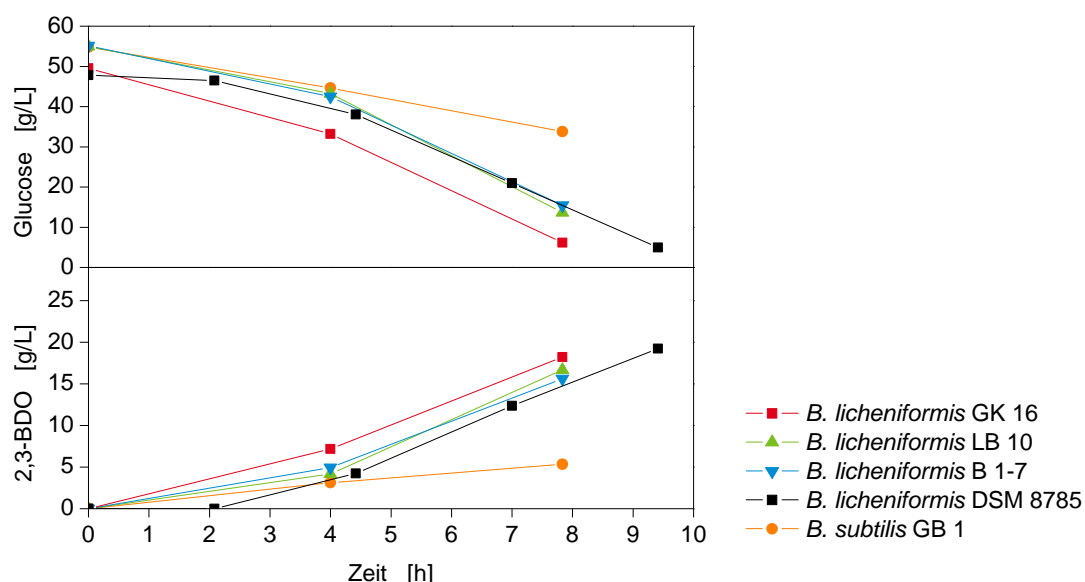


Abbildung 4.10: Glucoseverbrauch (oben) und 2,3-BDO-Bildung (unten) mit den Eigenisolaten GB 1, LB 10, B 1-7 und GK 16 und dem Referenzstamm *B. licheniformis* DSM 8785 bei einer Kultivierungstemperatur von 50 °C und einer Schüttelfrequenz von 125 rpm im 300 mL Schüttelkolben.

Der Stamm GB 1 verbrauchte nur wenig Zucker und die Ausbeute war mit 0,26 g/g gering. Da der Stamm im Screening im Mikrotiterplatten-Maßstab gute Ergebnisse erzielte, könnte die

geringe Umsetzung und Ausbeute mit den gewählten Kultivierungsparametern im Schüttelkolben einhergehen.

Die Stämme LB 10 und B 1-7 setzten die Glucose mit Ausbeuten von 0,39 – 0,4 g/g zu 2,3-BDO um. Die beste Umsetzung von Glucose zu 2,3-BDO erzielte der Stamm GK 16, mit einer Ausbeute von 0,42 g/g. Die Ausbeute lag, auch ohne Optimierungsversuche, nahe an der theoretisch maximalen Ausbeute von 0,5 g/g. Die Ausbeuten und Produktivitäten der *B. licheniformis*-Stämme LB 10, B 1-7 und GK 16 sind vergleichbar mit denen des Referenzstammes *B. licheniformis* DSM 8785.

4.1.3 Evaluierung der Screeningstämme hinsichtlich der Produktion von 2,3-Butandiol aus synthetischen Hydrolysaten

Nach den ersten Vorversuchen wurden die Stämme mit dem größten Potential zur Umsetzung von Xylose zu 2,3-BDO ausgewählt (Tabelle 4.6). Aus dem Screening nach der phylogenetischen Abstammung wurden 12 Stämme ausgewählt. Die *Geobacillus*-Stämme, *B. licheniformis* B-14209 und *P. polymyxa* B-719 wurden nicht weiter untersucht (vergl. Kapitel 4.1.1.2). Aus dem Screening der Umweltproben wurden die vier identifizierten Eigenisolate geprüft.

Tabelle 4.6: Vorauswahl der gescreenten Stämme.

Nummer	Stamm	Zusatz
1*	<i>Bacillus licheniformis</i>	DSM 8785
2	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	DSM 7
3	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	NRS-762
4	<i>Bacillus atrophaeus</i>	NRS-213
5	<i>Bacillus licheniformis</i>	B-23318
6	<i>Bacillus mojavensis</i>	B-14698
7	<i>Bacillus subtilis</i>	B-571
8	<i>Bacillus subtilis inaquosorum</i>	B-23056
9	<i>Bacillus vallismortis</i>	B-14891
10	<i>Paenibacillus polymyxa</i>	DSM 356
11	<i>Paenibacillus polymyxa</i>	B-369
12	<i>Paenibacillus polymyxa</i>	B-510
13**	<i>Bacillus licheniformis</i>	LB 10
14**	<i>Bacillus licheniformis</i>	B 1-7
15**	<i>Bacillus licheniformis</i>	GK 16
16**	<i>Bacillus subtilis</i>	GB 1
*	Referenz	
**	Eigenisolat	

4.1.3.1 Wahl eines pH-Puffersystems

In den ersten Vorversuchen des Screenings hat sich gezeigt, dass mit Xylose als Substrat der gewählte Phosphatpuffer in seiner Pufferkapazität nicht ausreichend war. Für die meisten Stämme ist der ideale Produktions-pH-Wert nicht bekannt, daher wurde ein Richtwert von pH 5,5 festgelegt, der nicht unterschritten werden sollte (vergl. Kapitel 2.1.4). Hierfür wurden drei Puffersysteme mit dem Referenzstamm *B. licheniformis* DSM 8785 getestet (Abbildung 4.11).

Das „ungepufferte“ Basal-HE-Medium weist eine Pufferkapazität durch den eingesetzten Hefeextrakt sowie dem enthaltenen Dikaliumhydrogenphosphat/Kaliumhydrogenphosphat (0,04 M) auf. Da die Pufferkapazität in den Vorversuchen nicht ausreichend war, wurde die Dikaliumhydrogenphosphat/Kaliumhydrogenphosphat-Lösung durch einen Phosphatpuffer pH 6,7 mit einer Molarität von 0,15 ersetzt. Das phosphatgepufferte Medium wies keine Verbesserung gegenüber dem ungepufferten System auf (Abbildung 4.11). Eine Erhöhung der Molarität und somit der Pufferkapazität, ist im Fall von Phosphatpuffer nicht zweckmäßig. Hohe Salz- und Phosphatkonzentrationen im Medium können einen hemmenden Effekt auf die Zellen ausüben. Zudem bindet Phosphat Magnesium-, Calcium- und Eisenionen und bildet unlösliche Präzipitate. Wichtige Nährstoffe stehen den Zellen dann nicht mehr zur Verfügung.

Als zweites Puffersystem wurde dem Medium Calciumcarbonat in zwei Konzentrationen zugesetzt. In beiden Ansätzen sank der pH-Wert innerhalb von 24 h auf unter 5,5. Der Einsatz von Calciumcarbonat konnte die Versäuerung kaum verhindern. Auch die Erhöhung der Calciumcarbonatkonzentration von 10 g/L auf 20 g/L hatte keinen Effekt auf die pH-Wert-Senkung.

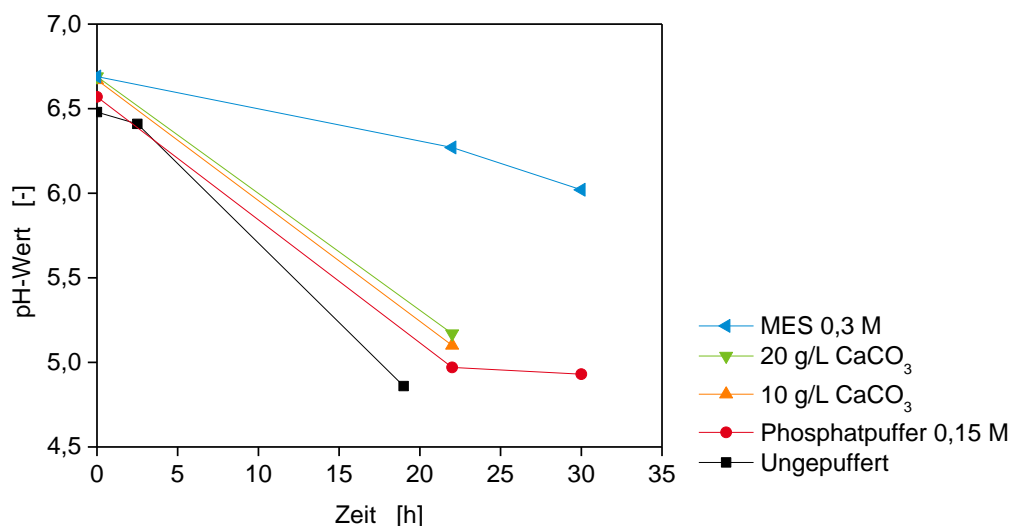


Abbildung 4.11: Kultivierung von *B. licheniformis* DSM 8785 mit verschiedenen Puffern. Kultivierung bei 50 °C mit CaCO₃, Phosphatpuffer und ungepuffert im 300 mL Schüttelkolben bei 125 rpm und mit MES in der 96-Well MTP bei 700 rpm.

Als dritter Puffer wurde MES getestet. MES ist ein Zwitterion mit einem Pufferbereich zwischen 5,8 und 6,5. Im durchgeführten Test war eine Molarität von 0,3 ausreichend, um den pH-Wert nach 30 h Kultivierung auf $\geq 6,0$ zu halten. Für die folgenden Screeningversuche wurde dem Basal-HE-Medium 0,3 M MES zugesetzt, wenn Xylose die einzige Kohlenstoffquelle war.

4.1.3.2 Vergleich der 2,3-Butandiolproduktion mit Glucose

Um Parameter wie die Produktivität im Screening besser vergleichen zu können, sollte eine Versuchsreihe folgen, in der alle Stämme bei gleichen Bedingungen kultiviert werden. Für die Kultivierungsparameter wurden jeweils mittlere Werte gewählt (Schüttelfrequenz/ Sauerstoffeintrag und Temperatur). Diese Einstellungen ergaben sich aus Vorversuchen (Daten nicht gezeigt). Die Bedingungen waren für keinen Stamm speziell optimiert. Mit diesen Einstellungen können die Produktionsleistungen miteinander verglichen und bewertet werden. Aufgrund des hohen Probendurchsatzes mit 16 Stämmen, wurden die Versuche in MTP durchgeführt. Für die Bewertung der Produktionsleistung wurden die Metaboliten Acetoin und 2,3-BDO als Produkt zusammengefasst (Abbildung 4.12).

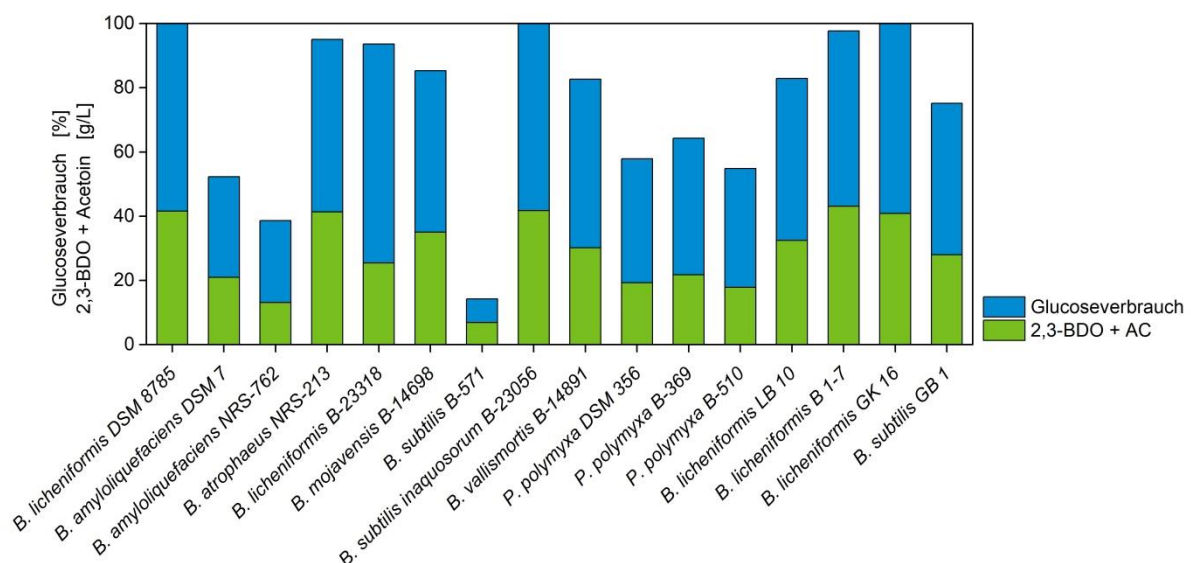


Abbildung 4.12: Glucoseverbrauch und Produktbildung von 16 Stämmen in Basal-HE-Medium mit 100 g/L Glucose. Kultivierung in 96-Well MTP bei 39 °C und 700 rpm für 30 h.

Der höchste Glucoseverbrauch und die höchste Ausbeute wurde von dem Referenzstamm *B. licheniformis* DSM 8785 erzielt. Dies war zudem der einzige Stamm, der die Glucose bereits nach 22,5 h vollständig verwertet hatte (Daten nicht gezeigt). Die erzielten Parameter 2,3-BDO-Konzentration (44,1 g/L), Ausbeute (0,45 g/g) und Produktivität (1,85 g/(L·h)) sind vergleichbar mit Werten, die in der Literatur beschrieben werden (Jurchescu et al. 2013, Li et al. 2013b) und mit denen aus den Vorversuchen. Die gewählten Kultivierungsparameter waren für *B. licheniformis* DSM 8785 gut geeignet.

Für die weiteren 15 Stämme waren die Kultivierungsparameter ebenfalls geeignet. *B. atrophaeus* NRS-213, *B. subtilis inaquosorum* B-23056, *B. mojavensis* B-14698, und *B. vallismortis* B-14891 sowie die Eigenisolate erzielten eine gute Glucoseumsetzung zu 2,3-BDO und Acetoin. Die Ausbeuten lagen zwischen 0,37 und 0,45 g/g.

Mit den Eigenisolaten wurden gute Ausbeuten und Produktivitäten erreicht. Die Isolate *B. licheniformis* B 1-7 und GK 16 erreichten etwa dieselbe Ausbeute wie der Referenzstamm. Die Ausbeuten der Isolate *B. licheniformis* LB 10 und *B. subtilis* GB 1 lagen mit 0,38 - 0,40 g/g unterhalb der Ausbeute vom Referenzstamm.

Die *P. polymyxa*-Stämme setzten die Glucose innerhalb von 30 h nicht vollständig um. Den höchsten Umsatz erzielte der Stamm B-369 mit 64 %. Die Ausbeuten lagen bei allen drei Stämmen zwischen 0,33 und 0,35 g/g. Im ersten Screeningdurchlauf im Schüttelkolben lagen die Ausbeuten mit 0,43 - 0,48 g/g höher (vergl. Kapitel 4.1.1.2). Für *P. polymyxa* B-510 wird eine Substrathemmung ab einer Glucosekonzentration von 60 g/L beschrieben (Jurchescu 2014). Die Substratkonzentration von 100 g/L könnte somit eine Ursache für die geringe Produktbildung sein.

B. subtilis B-571 und *B. amyloliquefaciens* NRS-762 konnten die Glucose nur zu geringen Mengen verwerten. Die Ergebnisse entsprechen den Vorversuchen, in denen die beiden Stämme ebenfalls geringe Mengen an Substrat umsetzten.

4.1.3.3 Vergleich der 2,3-Butandiol-Produktion mit Xylose

Fast alle Stämme erreichten mit reiner Glucose als Substrat gute Ausbeuten und Produktkonzentrationen. Im folgenden Versuch wurde der Umsatz von reiner Xylose untersucht (Abbildung 4.13).

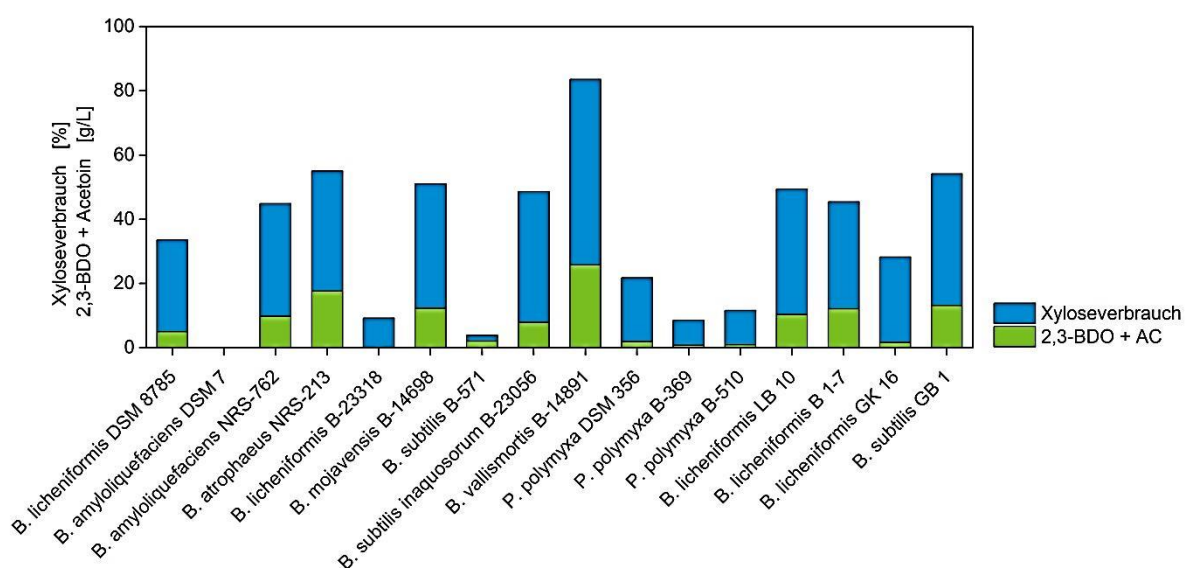


Abbildung 4.13: Xyloseverbrauch und Produktbildung von 16 Stämmen in Basal-HE-Medium mit 100 g/L Xylose und 0,3 M MES. Kultivierung in 96-Well MTP bei 39 °C, 700 rpm für 30 h.

Im Vergleich zu Glucose als Substrat fällt die 2,3-BDO-Produktion mit Xylose insgesamt geringer aus. In keinem der Ansätze sank der pH-Wert unter 5,5, wodurch eine pH-Inhibierung als Grund für den geringen Umsatz ausgeschlossen wird.

Der Referenzstamm *B. licheniformis* DSM 8785 verwertete die Xylose nur zu einem geringen Anteil. Innerhalb von 30 h nutzte der Stamm nur 35 % der zur Verfügung gestellten Xylose mit einer Produktausbeute von 0,15 g/g. Die Ergebnisse decken sich mit Untersuchungen von Guragain et al. 2017, in denen *B. licheniformis* DSM 8785 Glucose in einem Holz-Hydrolysat besser verwerten konnte als Xylose.

Bei den gewählten Kultivierungsbedingungen erzielte *B. vallismortis* B-14891 mit Abstand die höchsten Umsetzungsraten. Der Stamm setzte 83,5 % der Xylose zu 25,8 g/L 2,3-BDO und Acetoin um. Die Ausbeute lag bei 0,32 g/g. Ebenfalls gute Umsetzungsraten wurden mit *B. atrophaeus* NRS-213 erreicht. Der Xyloseverbrauch lag nach 30 h bei 55,0 %, mit einer Ausbeute von 0,33 g/g. Die erzielte Produktkonzentration lag bei 17,6 g/L.

Die Eigenisolate *B. licheniformis* LB 10 und B 1-7 erreichten Produktausbeuten von 0,21 und 0,27 g/g. Die Ausbeuten sind höher als die vom Referenzstamm. Auch der Stamm *B. subtilis* GB 1 erreichte mit 0,24 g/g eine höhere Ausbeute als der Referenzstamm. Der Stamm *B. licheniformis* GK 1 erreichte keinen guten Umsatz. Insgesamt war das Screening aus den Umweltproben erfolgreich. Das Ziel, Stämme zu finden, die eine höhere Umsetzung von Xylose haben als der Referenzstamm, wurde bei drei der vier Stämme erreicht.

B. amyloliquefaciens NRS-762, *B. mojavensis* B-14698 und *B. subtilis inaquosorum* B-23056 verbrauchten je ca. 50 % der Xylose innerhalb von 30 h, die Umsetzung zu 2,3-BDO war in allen drei Fällen vergleichbar mit den Umsätzen der Eigenisolate. Die *P. polymyxa*-Stämme, *B. licheniformis* B-23318, *B. subtilis* B-517 und *B. amyloliquefaciens* DSM 7 setzten die Xylose kaum bis gar nicht um.

4.1.3.4 Einfluss von Holz-Hydrolysatnebenprodukten auf die Produktbildung

Bei der Hydrolyse von lignocellulosehaltigem Material entstehen Nebenprodukte, die sich zum Teil negativ auf die biotechnologische Produktion von 2,3-BDO auswirken, die lag-Phase verlängern und/oder die Ausbeute und Produktivität der Mikroorganismen verringern (vergl. Kapitel 2.2.4).

Im folgenden Kapitel wurde die Sensitivität der einzelnen Stämme gegenüber typischer Holz-Hydrolysatnebenprodukte bestimmt. Hierfür wurden dem Basal-HE-Medium Nebenprodukte der drei Inhibitorgruppen zugesetzt (vergl. Kapitel 2.2.4). Die Mengen der Substanzen sind in Tabelle 4.7 angegeben und richteten sich nach Werten aus der Literatur (Jurchescu 2014). Als Kohlenstoffquelle wurden einmal 100 g/L Glucose und einmal 100 g/L Xylose zugesetzt.

Tabelle 4.7: Holz-Hydrolysatnebenprodukte in typischen Konzentrationen (nach Jurchescu 2014).

Substanz	Konzentration [g/L]
Ameisensäure	3,6
Essigsäure	1,2
Furfural	0,12
5-Hydroxymethylfurfural	0,16
4-Hydroxybenzoesäure	0,3
Syringaldehyd	0,02
Vanillin	0,014

Die Holz-Hydrolysatnebenprodukte wirken sich stammspezifisch aus, sodass keine allgemein gültige Aussage getroffen werden kann (Abbildung 4.14). Die Auswirkungen der Nebenprodukte wurden in drei Gruppen kategorisiert:

- I) kein Einfluss
- II) Steigerung des Substratumsatzes, der Ausbeute und/oder der Produktbildung
- III) Inhibition

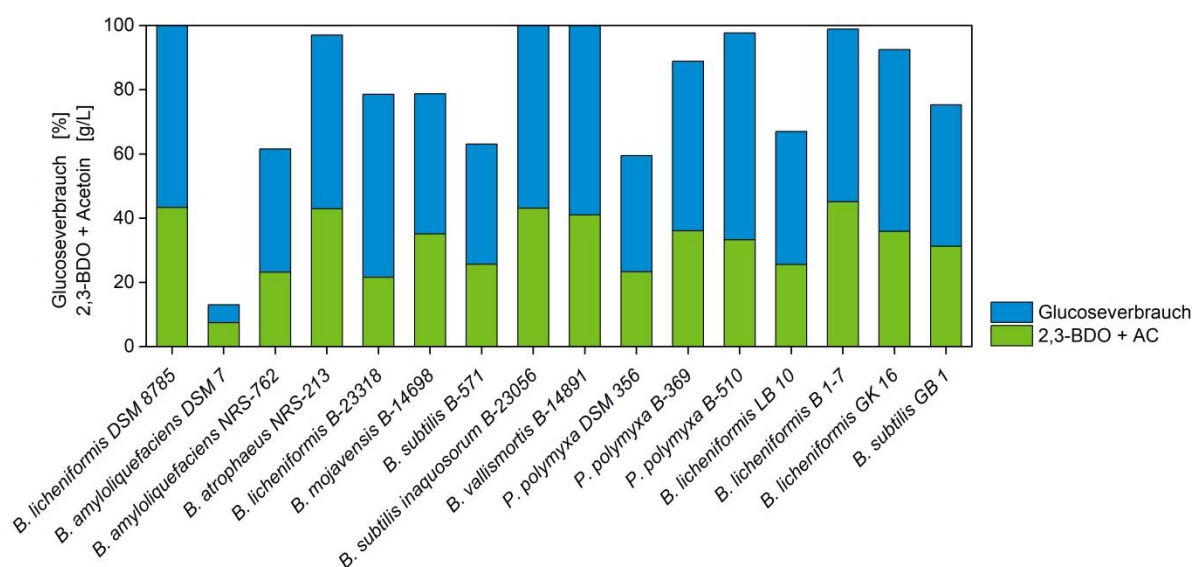


Abbildung 4.14: Glucoseverbrauch und 2,3-BDO- + Acetoinproduktion von 16 Stämmen in Basal-HE-Medium mit 100 g/L Glucose und Hydrolysatnebenprodukten. Kultivierung in 96-Well MTP bei 39 °C, 700 rpm für 30 h.

I) Auf die Stämme *B. licheniformis* DSM 8785 und B 1-7, *B. atrophaeus* NRS-213, *B. mojavensis* B-14698, *B. subtilis inaquosorum* B-23056, *B. subtilis* GB 1 und *P. polymyxa* DSM 356 hatte das synthetische Glucose-Hydrolysat keinen Einfluss. Der Substratumsatz, die Produktbildung und das Wachstum sind gleichbleibend zu der Kultivierung ohne Hydrolysatnebenprodukte (vergl. Abbildung 4.12). Auch wenn das synthetische Hydrolysat keinen Einfluss auf den Substratumsatz und die Produktbildung hatte, konnte bei den Stämmen

B. atrophaeus NRS-213, *B. mojavensis* B-14698 und *P. polymyxa* DSM 356 eine Verzögerung der lag-Phase (ca. 1h) festgestellt werden. Für die restlichen Stämme aus Gruppe I hatten die Hydrolysatnebenprodukte keinen Einfluss auf das Wachstum (Daten nicht gezeigt).

II) Auf 5 der getesteten Stämme zeigten die Nebenprodukte eine aktivierende Wirkung. Bei *B. amyloliquefaciens* NRS-762 ist der Glucoseumsatz von 40 auf 60 % gestiegen und es konnten etwa 10 g/L mehr Produkt gebildet werden. *B. vallismortis* B-14891 verwertete die gesamte Glucose innerhalb von 22 h und erreichte dieselben Produktmengen wie der Referenzstamm (Abbildung 4.12 und Abbildung 4.14). Neben *B. licheniformis* DSM 8785 und *B. vallismortis* B-14891 konnte kein weiterer Stamm die Glucose innerhalb von 22 h vollständig verwerten. Insgesamt wurden von *B. vallismortis* B-14891 41 g/L 2,3-BDO und Acetoin gebildet, das entspricht einer Produktausbeute von 0,42 g/g. Für den Stamm *P. polymyxa* B-369 stieg der Glucoseumsatz um 25 % und für B-510 sogar um 43 %. Beide Stämme produzierten etwa 15 g/L mehr Produkt als in dem Vergleichsexperiment ohne Nebenprodukte. Auf den Stamm *B. subtilis* B-571 hatten die Nebenprodukte die stärkste aktivierende Wirkung. Der Substratumsatz stieg von 15 % auf 63 %. Dabei wurden mit dem synthetischen Hydrolysat 19 g/L mehr Produkt gebildet, insgesamt 25,7 g/L 2,3-BDO und Acetoin. Dies entspricht einer Ausbeute von 0,42 g/g. Die Aktivierung wirkte sich zudem auf das Wachstum aus und verkürzte die lag-Phase um etwa 4 h (Daten nicht gezeigt). Mit dem Stamm konnten im vorherigen Screening nur geringe Substratumsätze und Produktbildungen erzielt werden. Es wurde vermutet, dass nicht die Kultivierungsparameter die Ursache für die geringe Leistung sind, sondern Limitierungen im Medium. Mit dem Ergebnis aus diesem Versuch wird diese Vermutung unterstützt. Welche Substanz oder Substanzen eine aktivierende Wirkung auf die einzelnen Bakterien haben, kann an dieser Stelle nicht geklärt werden.

III) Inhibierend wirkte sich das synthetische Glucose-Hydrolysat auf die Stämme *B. amyloliquefaciens* DSM 7, *B. licheniformis* B-23318 und LB 10 aus. Bei den *B. licheniformis*-Stämmen nahm der Substratumsatz um jeweils 15 % ab. Am stärksten wurde die Produktbildung des Stammes *B. amyloliquefaciens* DSM 7 inhibiert. Die Produktbildung nahm von 21,0 g/L auf 7,5 g/L 2,3-BDO und Acetoin ab und die lag-Phase verzögerte sich um 2 h. In den inhibierten Kultivierungen sank der pH-Wert nicht unter pH 6,0. Eine pH-Inhibierung wird daher ausgeschlossen und die Inhibierung wird durch ein oder mehrere Holz-Hydrolysatnebenprodukte verursacht.

Abbildung 4.15 zeigt den Einfluss von Holz-Hydrolysatnebenprodukten auf die Kultivierung der Screeningstämme mit dem Substrat Xylose. Bei allen Kultivierungen wurde durch die Nebenprodukte die lag-Phase verzögert. Im Hinblick auf den Substratumsatz und die Produktbildung wurden auch in diesem Versuch die Kultivierungsergebnisse der 16 Stämme den drei Kategorien zugeordnet.

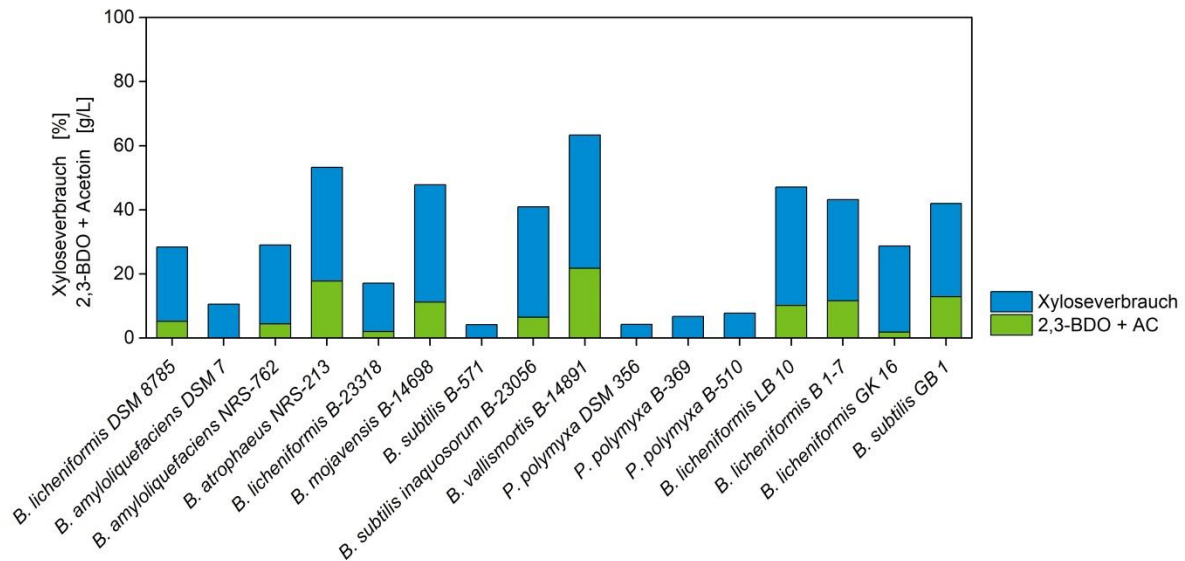


Abbildung 4.15: Xyloseverbrauch und 2,3-BDO- + Acetoinproduktion von 16 Stämmen in Basal-HE-Medium mit 100 g/L Xylose, 0,3 M MES und Hydrolysatnebenprodukten. Kultivierung in 96-Well MTP bei 39 °C, 700 rpm für 30 h.

I) Die Kultivierungen der Stämme *B. atrophaeus* NRS-213, *B. mojavensis* B-14698, *P. polymyxa* B-510 und die der Eigenisolate *B. licheniformis* LB 10, B 1-7 und GK 16 unterschieden sich nicht signifikant von den Kultivierungen ohne die Zugabe von Nebenprodukten (vergl. Abbildung 4.13).

II) Die Nebenprodukte im synthetischen Xylose-Hydrolysat hatten auf drei Kultivierungen eine aktivierende Wirkung. *B. vallismortis* B-14891 verbrauchte weniger Xylose innerhalb der 30 h, produzierte jedoch die gleichen Mengen an Produkt, wodurch die Ausbeute von 0,32 g/g auf 0,35 g/g stieg. *B. amyloliquefaciens* DSM 7 war in der Lage etwa 10 % Xylose zu verwerten, ohne die Nebenprodukte wurde kein Substrat aufgenommen. Jedoch wurde die Xylose zu Acetat und nicht zu 2,3-BDO oder Acetoin umgesetzt. *B. licheniformis* B-23318 verwertete mit den Hydrolysatnebenprodukten etwa die doppelte Menge an Xylose und bildete geringe Mengen an Produkt. Neben der geringfügigen Aktivierung der Xyloseverwertung, verlängerte sich die lag-Phase von 2 h auf 4 h (Daten nicht dargestellt). Die aktivierende Wirkung der Hydrolysatnebenprodukte war mit dem Substrat Xylose insgesamt nicht so ausgeprägt wie mit dem Substrat Glucose und die Aktivierung wirkte sich nicht auf dieselben Stämme aus.

III) Sieben der 16 Stämme wurden durch die Zugabe der Nebenprodukte, in Hinblick auf den Substratumsatz und/oder die Produktbildung, inhibiert. Am stärksten wurden die *P. polymyxa*-Stämme DSM 356 und B-369 inhibiert. Bei beiden Stämmen fand kein Wachstum statt. Bei den Stämmen *B. licheniformis* DSM 8785, *B. amyloliquefaciens* NRS-762, *B. subtilis* B-571, GB 1 und *B. subtilis inaquosorum* B-23056 war eine leichte Inhibierung des Substratumsatzes und/oder der Produktbildung zu erkennen.

4.1.4 Zusammenfassung des primären Screenings

Von ursprünglich 17 Stämmen aus dem phylogenetischen Screening und 226 Kolonien aus natürlichen Umweltproben wurden 16 Stämme ausgewählt und näher untersucht. In beiden Screeningmethoden waren die Auswahlkriterien gut gewählt, sodass eine Vielzahl an potentiellen 2,3-BDO-Produzenten gefunden wurde. Im phylogenetischen Screening waren mehrere Stämme zur Produktion von 2,3-BDO geeignet. Allgemein lässt sich nicht vorhersagen, wie gut nahe Verwandte von 2,3-BDO-Produzenten selbst auch 2,3-BDO produzieren. Dies wird besonders deutlich beim Stamm *B. subtilis* B-571. *B. subtilis*-Stämme sind für eine 2,3-BDO-Produktion bekannt. Der Stamm B-571 erzeugte jedoch in allen Screeningversuchen eher geringe Mengen an dem gewünschten Produkt. *B. subtilis inaquosorum* B-20356 hingegen ist ein Stamm mit Potential für die 2,3-BDO-Produktion.

Die nach dem Abstammungsverhältnis gescreenten Stämme *B. atrophaeus* NRS-213, *B. mojavensis* B-14698 und *B. vallismortis* B-14891 erreichten ebenfalls in allen Screeningversuchen gute 2,3-BDO- und Acetoinkonzentrationen. Keiner der Stämme war dabei als 2,3-BDO-Produzent in der Literatur beschrieben.

Der Stamm *B. atrophaeus* NRS-213 erzielte auf dem Reinsubstrat Glucose hohe Ausbeuten. Die Glucose wurde innerhalb des Untersuchungszeitraumes nicht vollständig verwertet, wodurch die Produktivität geringer war als beim Referenzstamm. Der Stamm wurde von den getesteten Hydrolysatnebenprodukten nicht beeinflusst. Zudem erreichte der Stamm mit dem Substrat Xylose und im synthetischen Hemicellulose-Hydrolysat höhere Produktkonzentrationen als der Referenzstamm.

B. vallismortis B-14891 konnte Glucose gut umsetzen, erzielte jedoch eine geringere Ausbeute und Produktivität als der Referenzstamm. Gegenüber der getesteten Hydrolysatnebenprodukte zeigt der Stamm eine hohe Resistenz. In den synthetischen Hydrolysaten wirkten die Hydrolysatnebenprodukte sogar aktivierend. Diese Eigenschaft ist interessant für den Einsatz realer Reststoffe als Substrat. Des Weiteren konnte der Stamm Xylose in allen Versuchen am besten verwerten. Die Ausbeute mit Xylose lag ohne optimierte Bedingungen bereits bei 0,35 g/g.

B. mojavensis B-14698 ist ebenfalls resistent gegenüber den getesteten Hydrolysatnebenprodukten. Die Kultivierungen mit und ohne Hydrolysatnebenprodukte verliefen nahezu identisch. Der Stamm ist zudem in der Lage, bei Temperaturen bis zu 50 °C zu wachsen und 2,3-BDO und Acetoin zu produzieren. Dieser hohe Temperaturbereich ist für einen SSF-Prozess gut geeignet.

Auch im Screening aus Umweltproben wurden gute 2,3-BDO-Produzenten isoliert. Mit dem Substrat Glucose erzielten die Stämme *B. licheniformis* LB 10 und GK 16 vergleichbare Ausbeuten wie der Referenzstamm. Mit dem Substrat Xylose produzierten drei der getesteten Eigenisolate (*B. licheniformis* LB 10 und B 1-7 sowie *B. subtilis* GB 1) deutlich

höhere Mengen an Produkt als der Referenzstamm. Der Stamm *B. licheniformis* B 1-7 war zudem tolerant gegenüber den Hydrolysatnebenprodukten.

Die Eigenisolate weisen großes Potential für eine 2,3-BDO-Produktion aus Holz-Hemicellulosen auf. Dennoch wurden im sekundären Screening nur die drei unbekannten 2,3-BDO-Produzenten *B. atrophaeus* NRS-213, *B. mojavensis* B-14698 und *B. vallismortis* B-14891 näher betrachtet.

4.2 Sekundäres Screening der Stämme *B. atrophaeus* NRS-213, *B. mojavensis* B-14698 und *B. vallismortis* B-14891

4.2.1 Substratscreening

Bei der Hydrolyse lignocellulosehaltiger Rohstoffe entstehen Zuckermischungen. Für einen effizienten Prozess ist es wichtig, dass der verwendete Mikroorganismus in der Lage ist, die verschiedenen Substrate effektiv zu verwerten (Yu und Saddler 1982). Die im primären Screening ausgewählten Stämme sowie der Referenzstamm wurden auf den Umfang ihres Substratspektrums getestet. Hierfür wurden verschiedene Hexosen, Pentosen, Disaccharide sowie Glycerin, Zuckersäuren und Polysaccharide getestet. Die Probenahme erfolgte zwischen 16 bis maximal 47 h (Tabelle A 1 bis Tabelle A 4). Abbildung 4.16 zeigt die Produktbildungen des Referenzstammes.

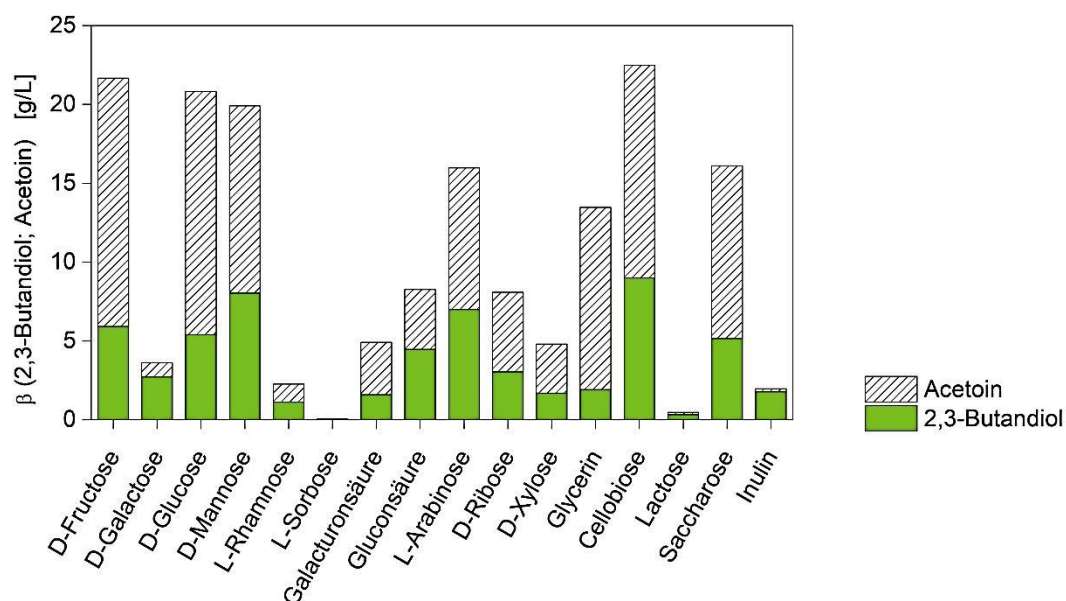


Abbildung 4.16: 2,3-BDO- und Acetoinproduktion mit dem Referenzstamm *B. licheniformis* DSM 8785 mit 16 verschiedenen Substraten als einzige Kohlenstoffquelle. Kultivierung in 96-Well MTP mit $56,7 \pm 4,1$ g/L Substrat bei 39 °C und 700 rpm für 16 - 47 h (vergl. Tabelle A 1). Durchführung im Doppelansatz.

Der Referenzstamm *B. licheniformis* DSM 8785 kann die meisten der angebotenen Substrate gut verwerten (Abbildung 4.16). Mit Glucose erreichte der Stamm eine Produktausbeute von

0,35 g/g (Tabelle A 1). Verglichen mit den drei Screening-Stämmen (Abbildung 4.17 - Abbildung 4.19) bildet *B. licheniformis* DSM 8785 mit 7 der 16 Substrate das meiste Produkt. Cellobiose verwertet der Referenzstamm deutlich effizienter als die anderen Stämme. D-Arabinose ist die einzige Pentose, die der Stamm effizient verwertet. Die Produktausbeute für D-Arabinose betrug 0,33 g/g. L-Sorbose wurde von *B. licheniformis* DSM 8785 nicht genutzt und mit L-Rhamnose, D-Xylose, Lactose und Inulin produzierte der Stamm kaum Produkt.

B. mojavensis B-14698 kann die Substrate D-Glucose, D-Mannose, D-Fructose und Saccharose gut verwerten (Abbildung 4.17). Mit diesen Substraten lagen die Ausbeuten zwischen 0,26 g/g und 0,33 g/g. Insgesamt produzierte der Stamm jedoch die geringsten Mengen an 2,3-BDO und Acetoin. Das Polysaccharid Inulin hingegen wurde von *B. mojavensis* B-14698 am besten verwertet. Dies ist ein Zeichen für eine hohe Inulinaseaktivität des Stammes. Inulin wurde zu 100 % mit einer Produktausbeute von 0,15 g/g umgesetzt (Tabelle A 2).

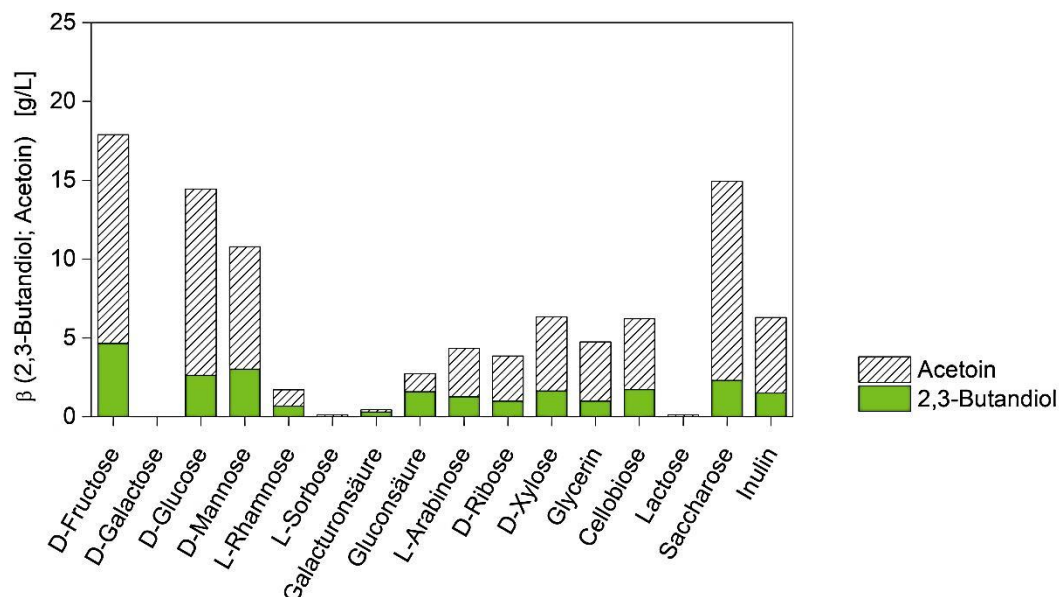


Abbildung 4.17: 2,3-BDO- und Acetoinproduktion mit *B. mojavensis* B-14698 mit 16 verschiedenen Substraten als einzige Kohlenstoffquelle. Kultivierung in 96-Well MTP mit $56,7 \pm 4,1$ g/L Substrat bei 39 °C und 700 rpm für 16 - 47 h (vergl. Tabelle A 2). Durchführung im Doppelansatz.

B. atrophaeus NRS-213 ist in der Lage, etwa die Hälfte der Substrate zu verwerten (Abbildung 4.18). Eine gute Produktbildung wird mit den Hexosen D-Glucose, D-Fructose und D-Mannose erzielt. In Hinblick auf die Nutzung von Zuckern, die nicht in Konkurrenz mit der Lebensmittel- und Futtermittelindustrie stehen, bietet dieser Stamm daher nur geringes Potenzial. Mit den Substraten Saccharose, D-Ribose und D-Xylose wurde überwiegend Acetoin gebildet, die Vorstufe zu 2,3-BDO, obwohl das Substrat noch nicht vollständig verbraucht war. Das Kultivierungsmilieu war demnach ungünstig für die 2,3-BDO Produktion. Unter gut abgestimmten Bedingungen könnte die 2,3-BDO-Produktion eventuell gesteigert werden.

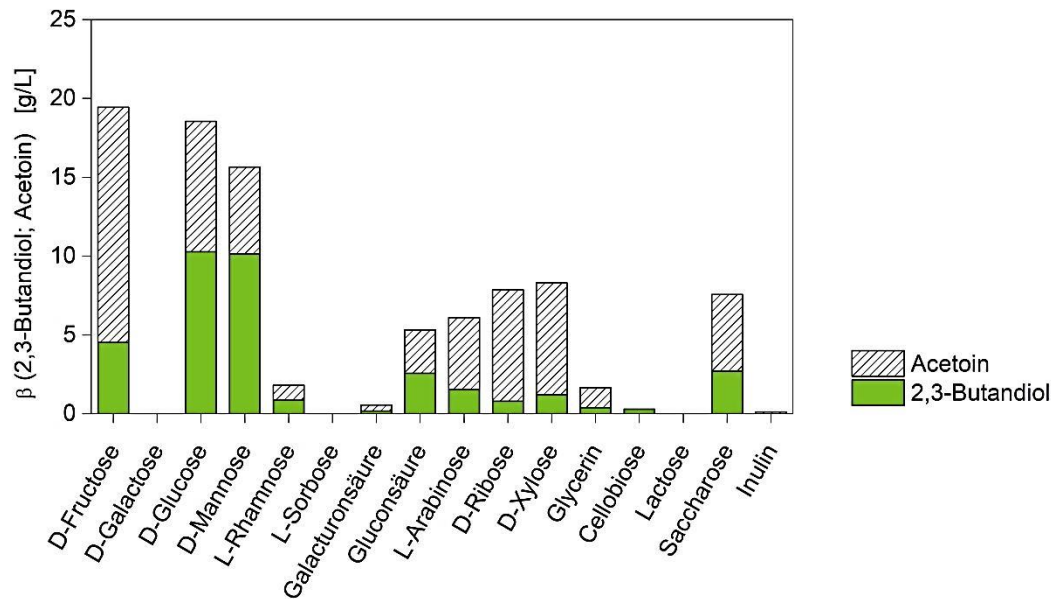


Abbildung 4.18: 2,3-BDO- und Acetoinproduktion mit *B. atrophaeus* NRS-213 mit 16 verschiedenen Substraten als einzige Kohlenstoffquelle. Kultivierung in 96-Well MTP mit $56,7 \pm 4,1$ g/L Substrat bei 39 °C und 700 rpm für 16 - 47 h (vergl. Tabelle A 3). Durchführung im Doppelansatz.

B. vallismortis B-14891 ist der einzige Stamm, der alle Substrate zur Produktbildung nutzte (Abbildung 4.19). Verglichen mit dem Referenzstamm und den zwei weiteren Teststämmen bildete *B. vallismortis* B-14891 mit 8 der 16 Substrate das meiste Produkt. Des Weiteren wurden alle dargebotenen Pentosen von *B. vallismortis* B-14891 effizienter verwertet als von den Vergleichsstämmen. L-Sorbose und Lactose eignen sich nicht für die 2,3-BDO- und Acetoinproduktion. Das breite Substratspektrum, das dieser Stamm aufweist, macht ihn interessant für die Nutzung von lignocellulosehaltigen Rohstoffen für die 2,3-BDO-Produktion.

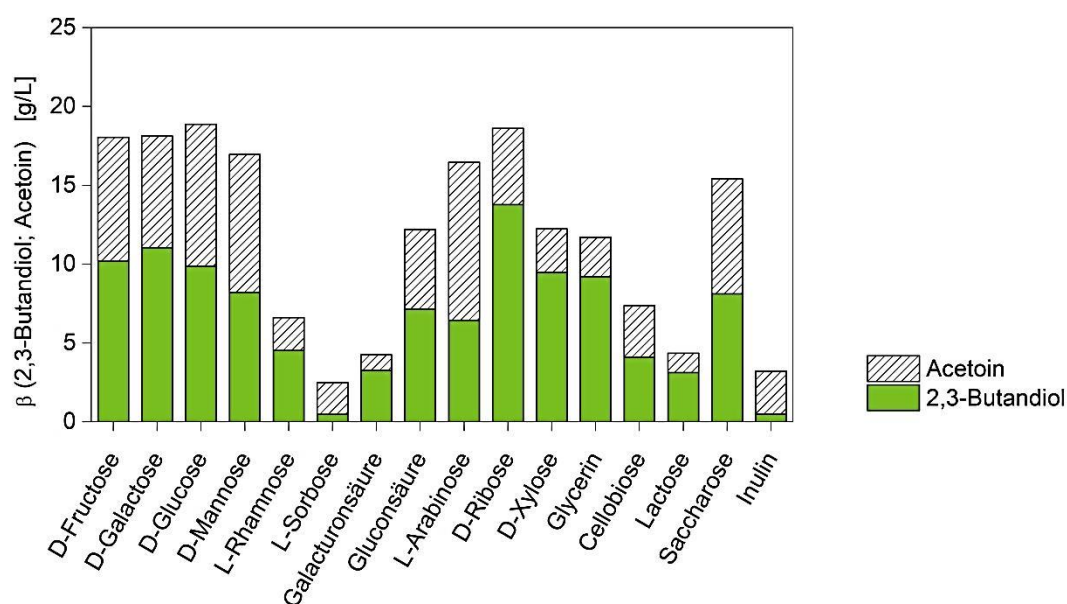


Abbildung 4.19: 2,3-BDO- und Acetoinproduktion mit *B. vallismortis* B-14891 mit 16 verschiedenen Substraten als einzige Kohlenstoffquelle. Kultivierung in 96-Well MTP mit $56,7 \pm 4,1$ g/L Substrat bei 39 °C und 700 rpm für 16 - 47 h (vergl. Tabelle A 4). Durchführung im Doppelansatz.

Allgemein lässt sich zusammenfassen, dass alle Stämme D-Glucose und D-Fructose am besten und L-Sorbose am schlechtesten verwerten. Mit Gluconsäure bilden alle Stämme vermehrt Acetat (Tabelle A 1 bis Tabelle A 4). *B. licheniformis* DSM 8785, *B. mojavensis* B-14698 und *B. vallismortis* B-14891 verwerten zudem Saccharose beinahe so gut wie D-Glucose. D-Xylose wird von den drei gescreenten Stämmen besser umgesetzt als vom Referenzstamm. Die Verwertbarkeit dieser Pentose spielt dabei eine entscheidende Rolle bei der Nutzung von lignocellulosehaltiger Biomasse. Neben Xylose sind wichtige Zucker in Holz-Hydrolysaten aus Laubhölzern die Hexosen Glucose, Rhamnose und Galactose sowie die Pentose Arabinose. In Holz-Hydrolysaten aus Nadelhölzern ist zusätzlich Mannose ein wichtiger Zucker. Tabelle 8 zeigt eine Übersicht der Verwertbarkeit dieser wichtigen Zuckermomere mit den verschiedenen Stämmen.

B. vallismortis B-14891 ist als einziger Stamm in der Lage, alle Zuckermomere zu verwerten, die aus Laub- und Nadelhölzern gewonnen werden können. Besonders deutlich wird dies bei Galactose. *B. atrophaeus* NRS-213 und *B. mojavensis* B-14698 bilden mit Galactose kein Produkt und *B. licheniformis* DSM 8785 nur geringe Mengen. Die Produktausbeute für *B. licheniformis* DSM 8785 lag bei 0,11 g/g (Tabelle A 1). *B. vallismortis* B-14891 hingegen setzte Galactose mit einer Ausbeute von 0,36 g/g um (Tabelle A 4). Die geringste Produktbildung weist *B. vallismortis* B-14891 mit Rhamnose auf. Die Verwertung ist dennoch noch höher als die der anderen Teststämmen.

Tabelle 4.8: Verwertbarkeit der wichtigsten Zucker aus Laub- und Nadelhölzern von *B. licheniformis* DSM 8785, *B. atrophaeus* NRS-213, *B. mojavensis* B-14698 und *B. vallismortis* B-14891. Die eingesetzte Substratkonzentration betrug $56,7 \pm 4,1$ g/L.

Substrat	<i>B. licheniformis</i> DSM 8785	<i>B. atrophaeus</i> NRS-213	<i>B. mojavensis</i> B-14698	<i>B. vallismortis</i> B-14891
Arabinose	+++	+	o	+++
Galactose	o	-	-	+++
Glucose	+++	+++	++	+++
Mannose	+++	+++	++	+++
Rhamnose	o	o	o	+
Xylose	o	+	+	++
+++ > 15 g/L 2,3-BDO + Acetoin	++ 10 – 15 g/L 2,3-BDO + Acetoin	+	5 – 10 g/L 2,3-BDO + Acetoin	
o < 5 g/L 2,3-BDO + Acetoin	- 0 g/L 2,3-BDO + Acetoin			

4.2.2 Kultivierung mit Xylan

Zur biotechnischen Umsetzung von Hemicellulose zu 2,3-BDO muss die Hemicellulose zuvor in ihre Monomere zersetzt werden. Einige Mikroorganismen verfügen über ein eigenes Enzymsystem zur Zersetzung der Hemicellulose und können die Hemicellulose direkt verwerten. Andere Mikroorganismen sind nicht in der Lage, Hemicellulose direkt zu verwenden. In diesem Fall müssen dem Medium Enzyme zugesetzt werden, die die Hemicellulose degradieren.

Die Stämme *B. atrophaeus* NRS-213, *B. mojavenensis* B-14698 und *B. vallismortis* B-14891 sowie der Referenzstamm *B. licheniformis* DSM 8785 wurden in Hinsicht auf die Hemicelluloseverwertung untersucht. In einer ersten Versuchsreihe wurden Maisxylan bzw. Haferspелzenxylan dem Medium als Modell-Substrat zugesetzt.

In Abbildung 4.20 sind die maximalen Produktkonzentrationen dargestellt, die innerhalb von 48 h von den vier Stämmen produziert worden sind. Der Referenzstamm ist weder in der Lage, das hochmolekulare Haferspелzenxylan noch das niedermolekulare Maisxylan zu verwerten. Dies spricht dafür, dass der Stamm kein eigenes Enzymsystem zur Verzuckerung von Xylan/Hemicellulose besitzt. Die Stämme *B. atrophaeus* NRS-213 und *B. vallismortis* B-14891 nutzten beide das kurzkettige Maisxylan, nicht aber das komplexere Haferspелzenxylan. Das Maisxylan wurde innerhalb von 48 h von *B. atrophaeus* NRS-213 vollständig verwertet. Dabei erreichte *B. atrophaeus* NRS-213 eine maximale Produktkonzentration von 2,3 g/L und *B. vallismortis* B-14891 erreichte eine maximale Produktkonzentration von 7,4 g/L nach 24 h. Zu dieser Zeit war das Maisxylan zu 97 % verbraucht. Mit zunehmender Kultivierungsdauer wurde gebildetes 2,3-BDO wieder zu Acetoin abgebaut.

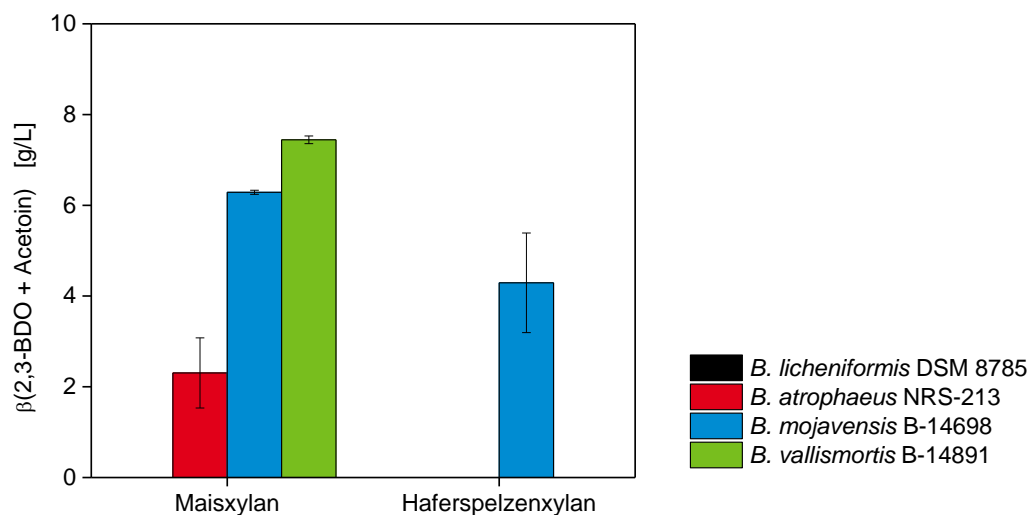


Abbildung 4.20: Maximale Produktbildung unter Verwendung von Maisxylan und Haferspелzenxylan als Substrat mit den Stämmen *B. licheniformis* DSM 8785, *B. atrophaeus* NRS-213, *B. mojavenensis* B-14698 und *B. vallismortis* B-14891. Kultivierung in 96-Well MTP bei 39 °C und 700 rpm für max. 48 h mit ca. 50 g/L Xylan. Durchführung im Doppelansatz.

B. mojavenensis B-14698 ist in der Lage, beide Xylane zu verwerten. Der Organismus scheint über ein eigenes Enzymsystem zur Spaltung von Xylan/Hemicellulosen zu verfügen. Die maximale Produktkonzentration mit Maisxylan betrug 6,3 g/L und mit Haferspелzenxylan 4,3 g/L. Beide maximalen Produktkonzentrationen wurden nach 24 h erreicht. Das Maisxylan war zu diesem Zeitpunkt zu 90 % abgebaut. Der Abbaugrad des Haferspелzenxylans konnte mit der HPLC-Methode nicht bestimmt werden.

Die Kultivierung der Stämme ohne Zugabe von Enzymen führte nur zu geringen Produktbildungen. Ein Ansatz, um die Produktbildung aus komplexen Substraten wie Xylane bzw. lignocellulosehaltiger Biomasse zu ermöglichen, ist die simultane Verzuckerung und Fermentation (SSF). In einer zweiten Versuchsreihe wurde daher ein SSF-Prozess mit dem Enzymgemisch Biogazyme 2x durchgeführt. Zusätzlich zum Maisxyylan und Haferspelzenxyylan wurde Buchenxyylan getestet. Kritische Parameter bei einem SSF-Prozess sind Temperatur und pH-Wert, da die Optima von Enzymen und Kultivierungsbedingungen für die Bakterien häufig voneinander abweichen. Für Biogazyme 2x liegt der optimale pH-Wert der Xylanaseaktivität bei pH 4,1, die optimale Temperatur bei 49,7 °C (Anders 2014). Der Start-pH-Wert für die Mikroorganismen hingegen liegt bei $6,6 \pm 0,1$ und eine geeignete Kultivierungstemperatur für *B. atrophaeus* NRS-213 und *B. vallismortis* B-14891 liegt bei ~ 39 °C und für *B. mojavensis* B-14698 bei ~ 41 °C.

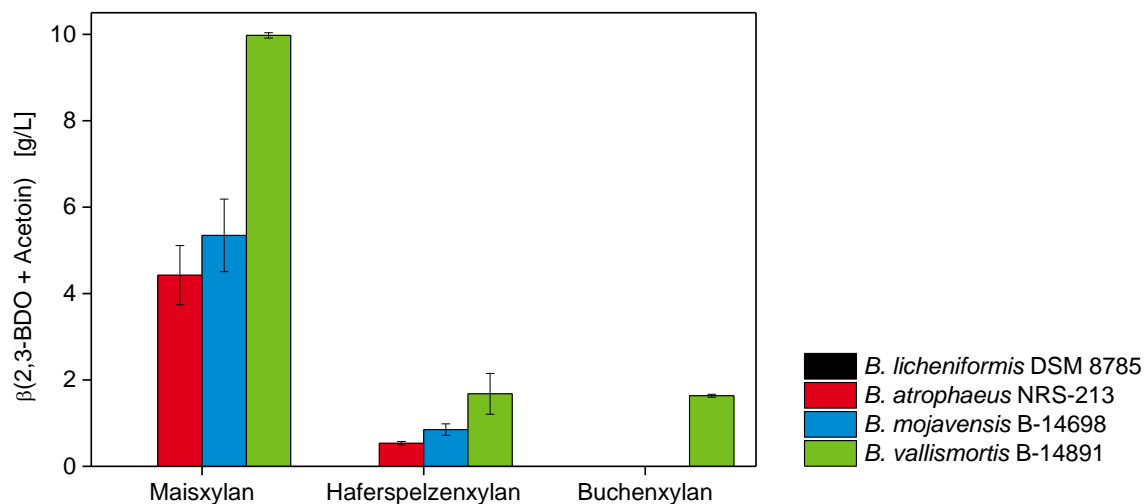


Abbildung 4.21: Maximale Produktbildung unter Verwendung von Maisxyylan, Haferspelzenxyylan und Buchenxyylan im SSF-Prozess mit Biogazyme 2x mit den Stämmen *B. licheniformis* DSM 8785, *B. atrophaeus* NRS-213, *B. mojavensis* B-14698 und *B. vallismortis* B-14891. Kultivierung in 96-Well MTP bei 39 °C für die Stämme *B. atrophaeus* NRS-213 und *B. vallismortis* B-14891 und 41 °C für *B. licheniformis* DSM 8785 und *B. mojavensis* B-14698 bei 700 rpm für max. 70 h. Durchführung im Doppelansatz.

Abbildung 4.21 zeigt die maximalen Produktkonzentrationen der SSF-Kultivierungen innerhalb von 70 h. Auch im SSF-Prozess war der Referenzstamm *B. licheniformis* DSM 8785 nicht in der Lage, Produkt zu bilden.

B. vallismortis B-14891 und *B. atrophaeus* NRS-213 steigerten die Produktbildung gegenüber den Kultivierungen ohne Enzymzusatz. *B. atrophaeus* NRS-213 produzierte mit Maisxyylan innerhalb von 24 h 4,4 g/L Produkt und *B. vallismortis* B-14891 10,0 g/L in 17 h. Zudem bildeten beide Stämme mit Haferspelzenxyylan und *B. vallismortis* B-14891 auch mit Buchenxyylan, geringe Mengen an Produkt. *B. mojavensis* B-14698 produzierte im SSF-Prozess

weniger Produkt. Die Zugabe des Enzymgemisches scheint den Stamm in der Produktbildung zu hemmen. Dies zeigt sich besonders bei der Kultivierung mit dem hochmolekularen Haferspelzenxyylan, bei der die Produktkonzentration von 4,3 g/L auf 0,9 g/L sank.

Trotz der Zugabe von Biogazyme 2x ist die Produktbildung gering. Ursache hierfür ist, dass die geeigneten Kultivierungsparameter für die Stämme von dem optimalen Arbeitsbereich der Xylanase abweichen. Es wurde untersucht, wie viel Xylose innerhalb von 48 - 70 h durch die Xylanase bei den Kultivierungsparametern für die Stämme freigesetzt wird (Abbildung 4.22 bis Abbildung 4.25).

Innerhalb von 48 h wurde vom Maisxyylan nur eine geringe Menge der höhermolekularen Fraktion 1 (Polysaccharidfraktion) abgebaut (Abbildung 4.22). Durch den enzymatischen Abbau der Fraktion 1 steigt der Gehalt an Fraktion 2 (Oligosaccharidfraktion) und Xylose (Peak 3). Die Fraktion 1 wurde innerhalb der 70 h nur zu einem geringen Teil umgewandelt. Dies verdeutlicht die schlechten Arbeitsbedingungen für das Enzymgemisch.

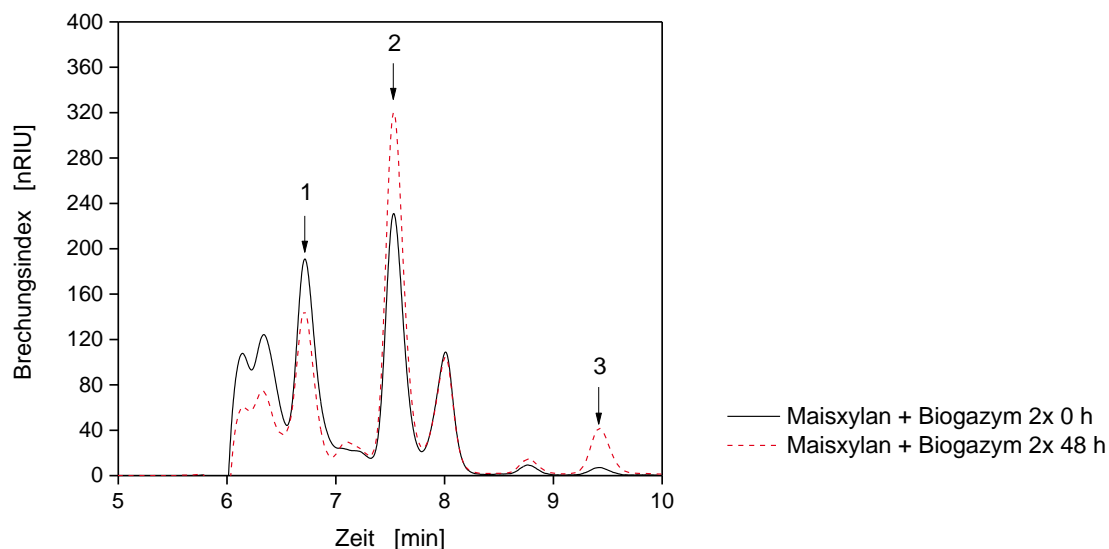


Abbildung 4.22: HPLC-Chromatogramm zur Veranschaulichung des Maisxyylan-Abbaus durch Biogazyme 2x in der 96-Well MTP bei 39 °C und 700 rpm. Die Pfeile zeigen 1: Polysaccharidfraktion, 2: Oligosaccharidfraktion, 3: Xylose.

Mit Haferspelzen- und Buchenxyylan konnten zum Zeitpunkt 0 keine oder nur sehr kleine Peaks zu den Retentionszeiten der Fraktion 1 und 2 detektiert werden. Nach einer Retentionszeit von 6 min trat ein relativ großer Peak im RI-Detektor auf. In dieser Fraktion lagen hochmolekulare Polymere vor. Die Xylane waren für die Poren der Größenausschlusschromatographiesäule zu groß und eluierten im Totvolumen nach etwa 6 min (Abbildung 4.23 und Abbildung 4.24).

Ergebnisse und Diskussion

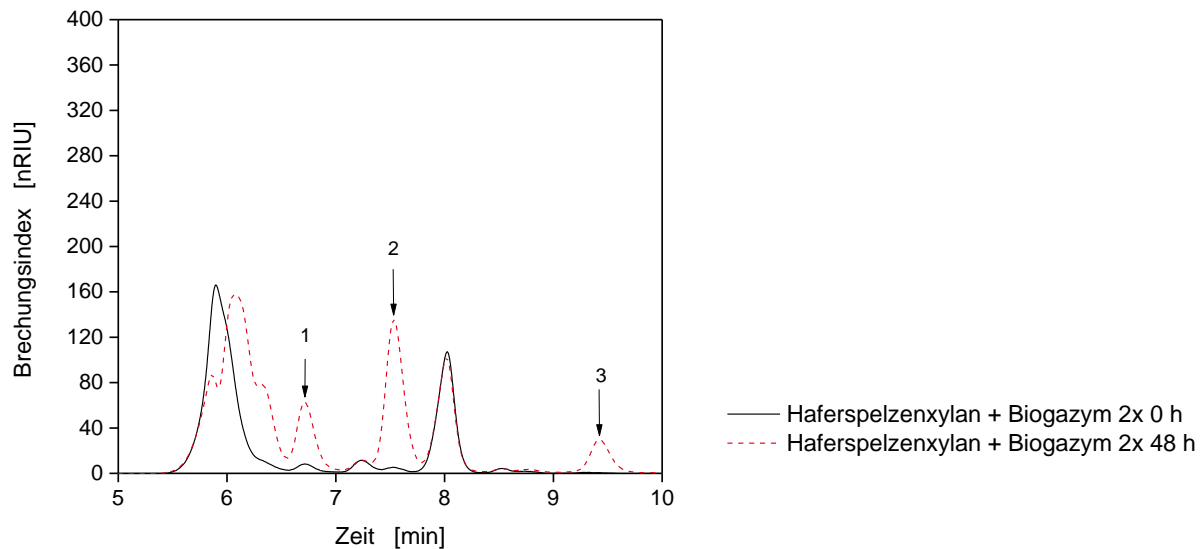


Abbildung 4.23: HPLC-Chromatogramm zur Veranschaulichung des Haferspelzenxylan-Abbaus durch Biogazyme 2x in der 96-Well MTP bei 39 °C und 700 rpm. Die Pfeile zeigen 1: Polysaccharidfraktion, 2: Oligosaccharidfraktion, 3: Xylose.

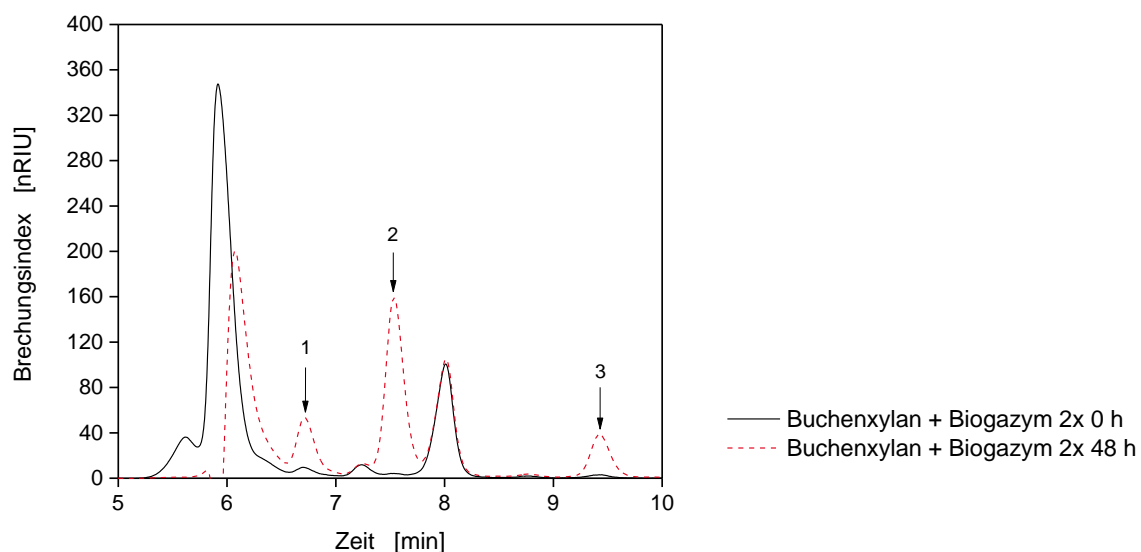


Abbildung 4.24: HPLC-Chromatogramm zur Veranschaulichung des Buchenxylan-Abbaus durch Biogazyme 2x in der 96-Well MTP bei 39 °C und 700 rpm. Die Pfeile zeigen 1: Polysaccharidfraktion, 2: Oligosaccharidfraktion, 3: Xylose.

Nach 48 h Inkubation mit Biogazyme 2x wurde ein Teil der hochmolekularen Xylane aus Haferspelzen und Buche durch das Enzymgemisch abgebaut (rote Chromatogramme Abbildung 4.23 und Abbildung 4.24). In beiden Referenzen entstanden als Abbauprodukte die Polysaccharidfraktion, die Oligosaccharidfraktion und Xylose. In der ersten Versuchsreihe ohne die Zugabe von Enzymen, wurde ermittelt, dass die Fraktion 1 und 2 sowie Xylose von

B. atrophaeus NRS 213, *B. mojavensis* B-14698 und *B. vallismortis* B-14891 zur 2,3-BDO-Produktion genutzt werden konnten. Der Abbau der Xylane war innerhalb von 48 h bei 39 °C und 700 rpm mit Biogazyme 2x nicht vollständig. Aus diesem Grund konnten die Stämme nur geringe Mengen an 2,3-BDO und Acetoin bilden. *B. licheniformis* DSM 8785 war nur in der Lage, die Xylose zu verwerten. Die Oligo- und Polysaccharide konnten von diesem Stamm nicht genutzt werden. Bei den vorliegenden Bedingungen wurden jedoch nur geringe Mengen an Xylose freigesetzt. Nach insgesamt 70 h Inkubation wurden in allen Referenzansätzen bei 39 °C etwa 3,6 – 3,8 g/L Xylose freigesetzt. Bei 41 °C war die Freisetzung etwas höher und betrug für Mais- und Buchenxylan 4,3 bzw. 4,0 g/L. Mit dem Haferspелzenxylan wurden innerhalb von 70 h 2,5 g/L Xylose freigesetzt (Abbildung 4.25).

Insgesamt waren die Kultivierungsparameter für das Enzymgemisch Biogazyme 2x ungeeignet. Ein SSF-Prozess ist daher nicht zweckmäßig und eine separate Verzuckerung und Fermentation ist als Prozessansatz vorzuziehen.

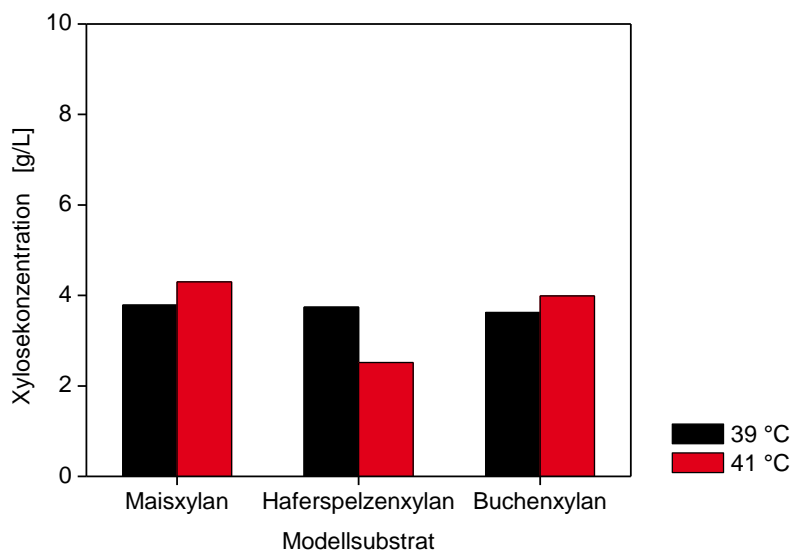


Abbildung 4.25: Xylosekonzentration nach 70 h Inkubation von jeweils 50 g/L Maisxylan, Haferspелzenxylan und Buchenxylan mit Biogazyme 2x in 96-Well MTP bei 39 °C bzw. 41 °C und 700 rpm.

4.2.3 Variation der Medienzusammensetzung

Bei dem im primären Screening verwendeten Medium handelte es sich um eine abgeänderte Variante des Basal Mediums nach Nakashimada et al. 1998 (siehe Kapitel 4.1.1.1). Im primären Screening konnte gezeigt werden, dass sich das Medium prinzipiell für die Kultivierung der meisten Stämme eignet. Um dennoch einer Limitierung oder Inhibierung einzelner Substanzen vorzubeugen, wurden die Medienkomponenten einzeln für die Stämme *B. licheniformis* DSM 8785, *B. atrophaeus* NRS-213, *B. mojavensis* B-14698 und *B. vallismortis* B-14891 variiert. Die Produktbildung in Abhängigkeit der Hefeextraktkonzentration wurde in Konzentrationen von 10, 8, 4, 2, 1 und 0 g/L untersucht. Für die restlichen Substanzen wurden die Konzentrationen um die Faktoren 0,1, 0,5 und 2 (bzw. 1,5

für die Kaliumphosphatlösung) variiert. Die Lösungen Dikaliumhydrogenphosphat und Kaliumdihydrogenphosphat (Lösung 3), Cobaltnitrat und Ammoniumeisensulfat (Lösung 5) sowie die Spurenelementlösung (Lösung 6) wurden nicht als einzelne Substanzen, sondern als Gesamtlösung variiert (vergl. Kapitel 3.3.5). Die Glucosekonzentration betrug in allen Kultivierungen 100 g/L. Die Zusammensetzung der angepassten Medien nach der Variation der einzelnen Substanzen ist in Tabelle 4.9 dargestellt.

Tabelle 4.9: Angepasste Medienzusammensetzung nach Variation einzelner Mediensubstanzen mit den Stämmen *B. licheniformis* DSM 8785, *B. atrophaeus* NRS-213, *B. mojavensis* B-14698 und *B. vallismortis* B-14891. Kultivierung in 96-Well MTP bei 39 °C und 700 rpm für 30 h und einer Glucosestartkonzentration von 100 g/L. Änderungen in der Substanzkonzentration gegenüber dem Basal-HE-Medium sind fett markiert.

	<u>Basal-HE-</u>	<u><i>B. licheniformis</i></u>	<u><i>B. atrophaeus</i></u>	<u><i>B. mojavensis</i></u>	<u><i>B. vallismortis</i></u>
	<u>Medium</u>	<u>DSM 8785</u>	<u>NRS-213</u>	<u>B-14698</u>	<u>B-14891</u>
	Konz.	Konz.	Konz.	Konz.	Konz.
Substanz	[g/L]	[g/L]	[g/L]	[g/L]	[g/L]
Hefeextrakt	10	10	10	8	8
K ₂ HPO ₄	7	7	7	10,5	7
KH ₂ PO ₄	5,5	5,5	5,5	8,25	5,5
(NH ₄) ₂ SO ₄	1	1	1	2	1
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	0,25	0,25	0,25	0,5	0,25
Na ₂ MoO ₄ · 2 H ₂ O	0,12	0,12	0,12	0,24	0,012
CaCl ₂ · 2 H ₂ O	0,021	0,021	0,021	0,0021	0,042
Co(NO ₃) ₂ · 6 H ₂ O	0,0029	0,0029	0,0029	0,0058	0,0029
(NH ₄) ₂ Fe(SO ₄) ₂ · 6 H ₂ O	0,0039	0,0039	0,0039	0,0078	0,0039
Spurenelemente	10 mL/L	10 mL/L	20 mL/L	10 mL/L	20 mL/L

Hefeextrakt ist ein Komplexbestandteil im Medium und verursacht einen Großteil der Kosten für die Medienherstellung. Die Mikroorganismen werden durch den Hefeextrakt unter anderem mit Stickstoff, Aminosäuren, Peptiden und Vitaminen versorgt. Die Reduzierung der Hefeextraktsupplementierung führt zu signifikanter Reduzierung der Produktionskosten von 2,3-BDO (Koutinas et al. 2016). Für einen wirtschaftlichen Prozess ist es essentiell, dass der verwendete Mikroorganismus wenig Hefeextrakt benötigt.

Mit *B. licheniformis* DSM 8785 und *B. mojavensis* B-14698 war die Produktbildung bei 8 g/L Hefeextrakt am höchsten und nahm mit abnehmender Hefeextraktkonzentration ab (Abbildung 4.26). Die Ausbeuten betrugen 0,42 g/g bzw. 0,40 g/g. Ohne Hefeextrakt sind beide Stämme nicht mehr in der Lage, Produkt zu bilden. Das Wachstum von *B. licheniformis* DSM 8785 wurde mit sinkender Hefeextraktkonzentration stärker beeinflusst, als das von *B. mojavensis* B-14698. Die lag-Phase betrug beim Referenzstamm mit 2 g/L Hefeextrakt etwa 6 h und bei *B. mojavensis* B-14698 etwa 2 h (Abbildung 4.27).

B. atrophaeus NRS-213 produzierte mit 8 und 10 g/L Hefeextrakt die höchste Produktmenge (Abbildung 4.26). Die Ausbeute lag mit 0,48 – 0,49 g/g nahe am theoretischen Maximum von

0,5 g/g. Mit geringeren Mengen an Hefeextrakt nahm die Produktbildung ab. Ohne Hefeextrakt ist der Stamm nicht in der Lage zu wachsen (Abbildung 4.27) oder Produkt zu bilden.

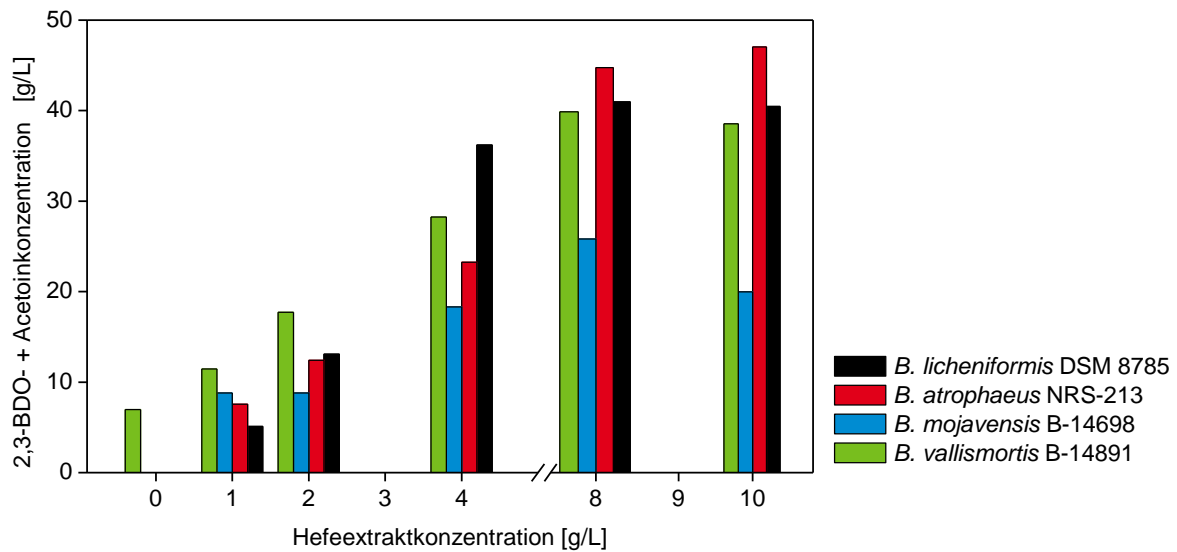


Abbildung 4.26: Produktbildung in Abhängigkeit der Hefeextraktkonzentration mit den Stämmen *B. licheniformis* DSM 8785, *B. atrophaeus* NRS-213, *B. mojavensis* B-14698 und *B. vallismortis* B-14891. Kultivierung in 96-Well MTP bei 39 °C und 700 rpm für 30 h und einer Glucosestartkonzentration von 100 g/L.

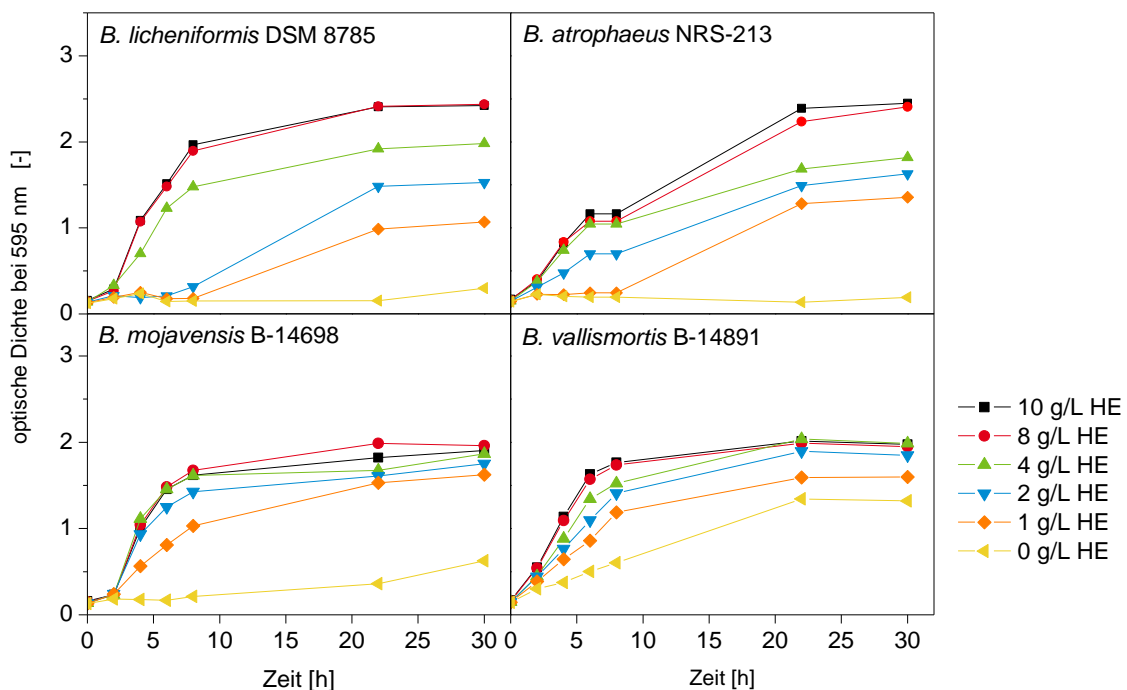


Abbildung 4.27: Optische Dichte bei 595 nm im Kultivierungsverlauf von *B. licheniformis* DSM 8785, *B. atrophaeus* NRS-213, *B. mojavensis* B-14698 und *B. vallismortis* B-14891 in Abhängigkeit der Hefeextraktkonzentration. Kultivierung in 96-Well MTP bei 39 °C und 700 rpm für 30 h und einer Glucosestartkonzentration von 100 g/L.

B. vallismortis B-14891 benötigte als einziger Stamm in dieser Versuchsreihe kein Hefeextrakt für die Produktbildung. Ohne Hefeextrakt wurden 7,0 g/L Produkt gebildet. Zwar war auch in diesem Versuch eine Abnahme der 2,3-BDO-Konzentration mit abnehmender Hefeextraktkonzentration zu beobachten, diese ist aber mit einer pH-Inhibierung zu begründen. Innerhalb von 22 h sank der pH-Wert auf 4,2 ab. Dass der pH-Wert und nicht die Hefeextraktkonzentration inhibierend war, zeigt sich am Wachstum (Abbildung 4.27). Die Hefeextraktkonzentration hatte keinen Einfluss auf die lag-Phase. In allen Ansätzen startete das Wachstum direkt nach der Inokulation. Mit abnehmender Hefeextraktkonzentration nahm jedoch die Wachstumsrate ab.

Für die anderen Stämme konnte keine pH-Inhibierung beobachtet werden, sodass bei diesen Stämmen von einer Nährstofflimitierung ausgegangen werden kann (Tabelle 4.10).

Tabelle 4.10: pH-Werte nach 30 h Kultivierung von *B. licheniformis* DSM 8785, *B. atrophaeus* NRS-213, *B. mojavensis* B-14698 und *B. vallismortis* B-14891 in Abhängigkeit der Hefeextraktkonzentration im Basal-HE-Medium. Kultivierung in 96-Well MTP bei 39 °C und 700 rpm für 30 h und einer Glucosestartkonzentration von 100 g/L.

Hefeextrakt- konzentration [g/L]	<u><i>B. licheniformis</i></u> DSM 8785 pH-Wert [-]	<u><i>B. atrophaeus</i></u> NRS-213 pH-Wert [-]	<u><i>B. mojavensis</i></u> B-14698 pH-Wert [-]	<u><i>B. vallismortis</i></u> B-14891 pH-Wert [-]
10	6,6	6,5	5,0	5,6
8	6,0	6,4	5,0	5,6
4	6,2	6,1	6,0	4,5
2	6,0	6,0	5,7	4,4
1	5,8	6,1	5,7	4,2
0	6,2	6,6	5,7	4,2

Für den Referenzstamm *B. licheniformis* DSM 8785 zeigte die Medienvariation, dass das Basal-HE-Medium in seiner Zusammensetzung gut geeignet ist (Tabelle 4.9). Eine Änderung einzelner Substanzen bzw. Lösungen führte jeweils zu einer Abnahme der Produktbildung. Für den Stamm *B. atrophaeus* NRS-213 führte nur die Erhöhung der Spurenelementlösung zu einer Steigerung der Produktendkonzentration. Die 2,3-BDO- und Acetoinkonzentration stieg dabei von 43,6 g/L auf 45,3 g/L. Für den Stamm *B. vallismortis* B-14891 führte die Änderung der Hefeextrakt-, Calciumchlorid- und Spurenelementkonzentration zu einer Produktsteigerung. Bei *B. mojavensis* B-14698 führte beinahe jede Variation zu einer Erhöhung der 2,3-BDO- und Acetoinkonzentration. Es zeigt sich, dass der Stamm eine höhere Salzkonzentration benötigt, als im Basal-HE-Medium vorliegt. Mit der Konzentrationserhöhung eines Salzes stieg die Produktausbeute. Eine Ausnahme bildete Calciumchlorid, hier reagierte der Stamm sensitiv auf eine Konzentrationserhöhung und eine Reduzierung der Konzentration wirkte sich positiv aus.

In Abbildung 4.28 sind die Produktbildungen in den angepassten Medien (vergl. Tabelle 4.9) für die Stämme *B. atrophaeus* NRS-213, *B. mojavensis* B-14698 und *B. vallismortis* B-14891 dargestellt. Für *B. atrophaeus* NRS-213 brachte die Medienanpassung keine signifikante Änderung der Kultivierung. Der Substratumsatz, die Produktbildung und die Ausbeute waren nahezu gleich. Für *B. vallismortis* B-14891 wirkte sich die Kombination der einzelnen Substanzkonzentrationsänderungen negativ aus. Die Produktbildung betrug im Basal-HE-Medium 36,9 g/L 2,3-BDO und Acetoin. Im angepassten Medium sank die Produktkonzentration auf 28,4 g/L. Für *B. atrophaeus* NRS-213 und *B. vallismortis* B-14891 wurde daher weiterhin das Basal-HE-Medium in seiner ursprünglichen Zusammensetzung verwendet.

Für *B. mojavensis* B-14698 stieg im angepassten Medium der Substratumsatz um 17,5 % und die Ausbeute von 0,41 g/g auf 0,45 g/g. Durch den höheren Substratumsatz stieg auch die Produktendkonzentration. Dabei änderte sich das Verhältnis von Acetoin zu 2,3-BDO zugunsten von 2,3-BDO. Im Referenzmedium wurden 9,7 g/L 2,3-BDO und 17,4 g/L Acetoin gebildet und im angepassten Medium 22,2 g/L 2,3-BDO und 13,5 g/L Acetoin. Die Kombination der einzeln variierten Substanzen brachte kaum eine Verbesserung gegenüber nur einzeln variierten Substanzen. Aus dem Grund wurde eine zusätzliche Versuchsreihe durchgeführt, in der die Substanzen Magnesiumsulfat und Ammoniumsulfat nochmals variiert wurden (Abbildung 4.29 und Abbildung 4.30).

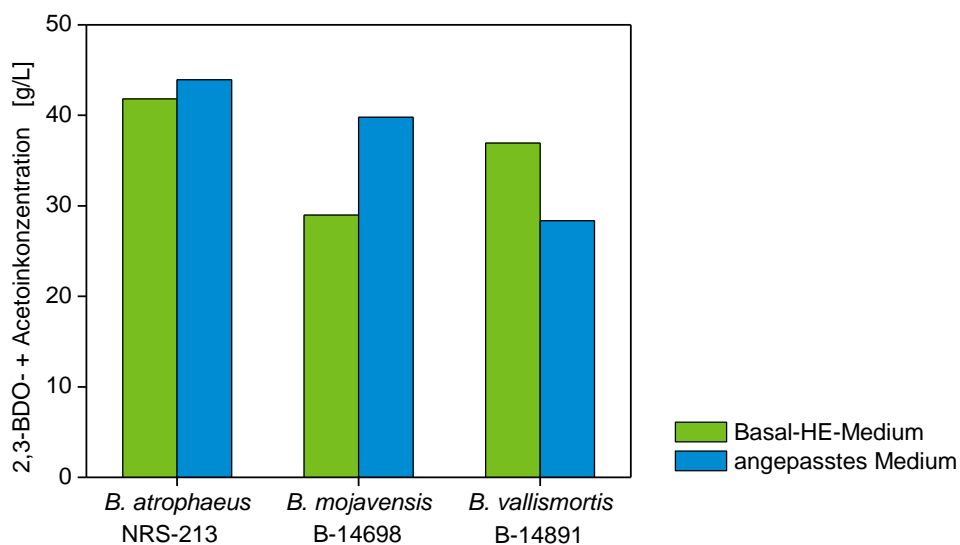


Abbildung 4.28: Vergleich der Produktendkonzentration (2,3-BDO und Acetoin) im Basal-HE-Medium und im angepassten Medium mit den Stämmen *B. atrophaeus* NRS-213, *B. mojavensis* B-14698 und *B. vallismortis* B-14891. Kultivierung in 96-Well MTP bei 39 °C und 700 rpm für 30 h. Die Glucosestartkonzentration betrug 100 g/L.

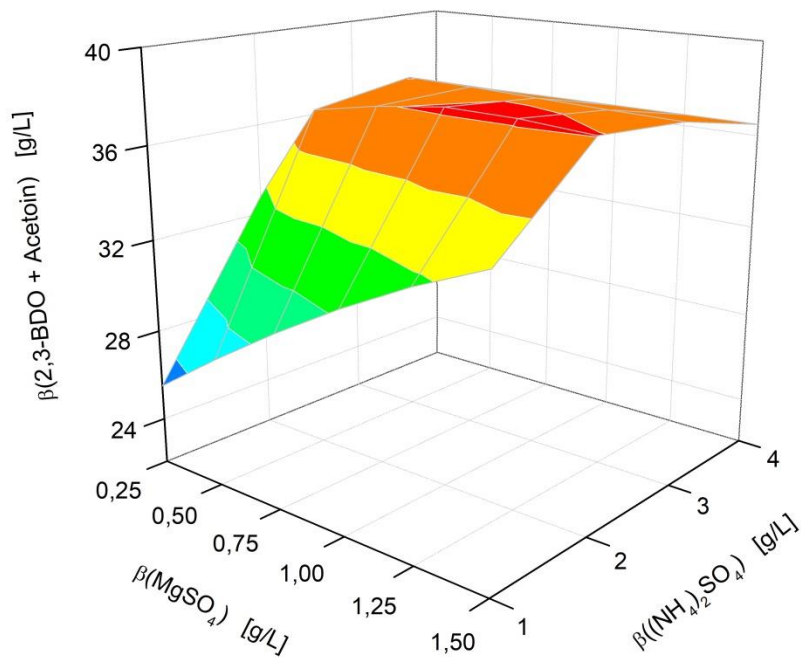


Abbildung 4.29: 2,3-BDO- + Acetoinkonzentration in Abhängigkeit der MgSO_4 - und $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Konzentration im Basal-HE-Medium mit dem Stamm *B. mojavensis* B-14698. Kultivierung in 96-Well MTP bei 39 °C und 700 rpm für 30 h. Die Glucosekonzentration betrug 100 g/L.

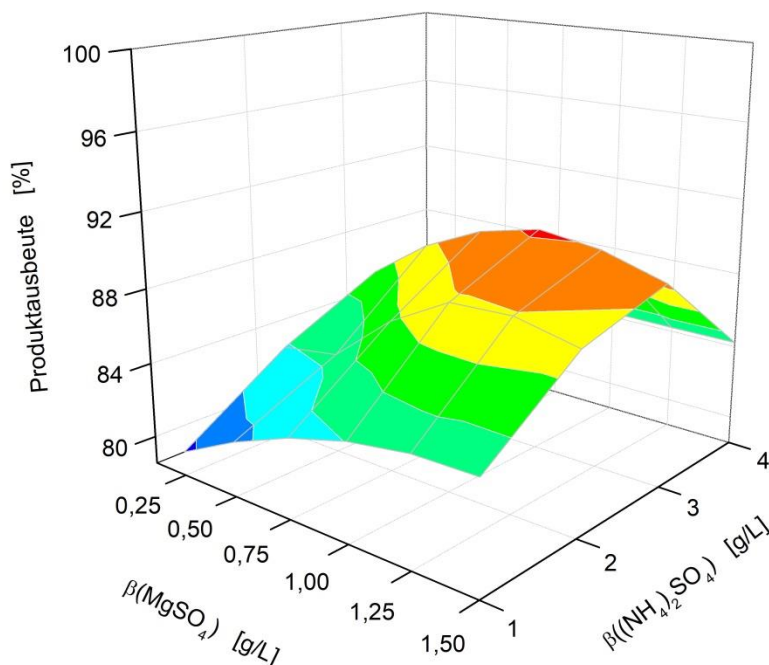


Abbildung 4.30: Prozentuale Produktausbeute (2,3-BDO + Acetoin) in Abhängigkeit der MgSO_4 - und $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Konzentration im Basal-HE-Medium mit dem Stamm *B. mojavensis* B-14698. Kultivierung in 96-Well MTP bei 39 °C und 700 rpm für 30 h. Die Glucosekonzentration betrug 100 g/L.

Mit einer Verdoppelung der ursprünglichen Konzentration an Ammoniumsulfat und Magnesiumsulfat stieg die Produktendkonzentration von 25,5 g/L auf 37,1 g/L (Abbildung 4.29). In diesem Ansatz war zudem der Substratumsatz am schnellsten (Daten nicht dargestellt). Eine weitere Erhöhung der beiden Substanzkonzentrationen führte zu keiner weiteren Steigerung der Produktendkonzentration und der Substratumsatz sank. Für die Ausbeute bildete sich ein Maximum bei 3 g/L Ammoniumsulfat und 1 g/L Magnesiumsulfat aus (Abbildung 4.30). Der Substratumsatz war in diesem Ansatz jedoch am geringsten. Im Vergleich zum Ansatz mit 2 g/L Ammoniumsulfat und 0,5 g/L Magnesiumsulfat sank der Glucoseumsatz um 5,3 %.

4.2.4 Maximale initiale Glucosekonzentration

Für einen effizienten Prozess ist die Startkonzentration der Kohlenstoffquelle wichtig. Mit steigender Konzentration der Kohlenstoffquelle kann die theoretisch maximal erreichbare 2,3-BDO-Endkonzentration proportional erhöht werden. Für Pentosen und Hexosen liegt die theoretische Ausbeute bei 0,5 g/g. Die theoretische maximale Endkonzentration wird nur erreicht, wenn keine Medienkomponenten limitierend sind und die Mikroorganismen nicht aufgrund der initialen Substratkonzentration selbst oder durch angereicherte Metaboliten inhibiert werden. Der Referenzstamm wurde von Jurchescu et. al 2013 hinsichtlich der maximalen initialen Glucosekonzentration untersucht. Diese liegt bei 180 g/L, dabei wurden 72,6 g/L 2,3-BDO und 5,4 g/L Acetoin produziert. Diese Werte dienen als Referenzwerte.

Für die Stämme *B. atrophaeus* NRS-213, *B. mojavensis* B-14698 und *B. vallismortis* B-14891 wurde die maximale initiale Glucosekonzentration bestimmt. Die Kultivierungen wurden durchgeführt, bis der Substratverbrauch zwischen 90 und 100 % lag oder kein Substrat mehr verbraucht wurde. Für die Versuche wurde mit dem Substrat Glucose gearbeitet, da hier geringere Versäuerungseffekte auftreten. Die tatsächlichen initialen Glucosekonzentrationen weichen von den Soll-Werten bis zu 13 % ab (Tabelle 4.11). Diese Ungenauigkeiten ergaben sich aus der hohen Viskosität der pipettierten Glucoselösung.

Tabelle 4.11: Abweichung der initialen Glucosekonzentration von den Soll-Werten für die Kultivierungen mit *B. atrophaeus* NRS-213, *B. mojavensis* B-14698 und *B. vallismortis* B-14891. Kultivierung in 96-Well MTP bei 39 °C und 700 rpm.

Soll-Glucose- konzentration [g/L]	<u><i>B. atrophaeus</i></u> <u>NRS-213</u>	<u><i>B. mojavensis</i></u> <u>B-14698</u>	<u><i>B. vallismortis</i></u> <u>B-14891</u>
	Ist-Konzentration [g/L]	Ist-Konzentration [g/L]	Ist-Konzentration [g/L]
60	58	61	60
80	77	81	82
100	97	113	100
120	122	120	120
140	134	139	141
160	153	154	162
180	176	173	182
200	193	189	200

Abbildung 4.31 zeigt die Produktbildung bei steigender initialer Glucosekonzentration mit dem Stamm *B. atrophaeus* NRS-213. Bei einer initialen Glucosekonzentration von 122 g/L wird eine maximale Produktkonzentration von 52,4 g/L erreicht. Mit einer Erhöhung der Glucosestartkonzentration erhöht sich die Produktausbeute nicht weiter, da der Stamm nicht mehr in der Lage ist, die Glucose vollständig zu verwerten. In den Ansätzen > 120 g/L Glucose werden etwa 125 bis 130 g/L Glucose verbraucht, bevor die Kultivierung zum Erliegen kommt. Die Endkonzentration an gebildetem 2,3-BDO sinkt dabei mit steigender Glucosekonzentration, die Produktendkonzentration (2,3-BDO und Acetoin) ist gleichbleibend bei ca. 52 ± 2 g/L. Dieses Kultivierungsverhalten könnte an einer Limitierung von Medienbestandteilen oder der Anreicherung von Metaboliten liegen. Der Acetoinanteil ist bei allen Glucosestartkonzentrationen relativ hoch. Bei einer initialen Glucosekonzentration von 60 g/L liegt das Verhältnis von 2,3-BDO zu Acetoin bei 2,6 und sinkt mit zunehmender Glucosekonzentration auf 0,5 (Tabelle 4.12). Durch eine Variation der Schüttelfrequenz bzw. des Sauerstoffeintrags könnte der Acetoinanteil zu Gunsten von 2,3-BDO verringert werden (De Mas et al. 1988). Die höchste 2,3-BDO-Konzentration von 29,9 g/L wurde mit einer initialen Glucosekonzentration von 97 g/L erreicht. Die maximale Produktivität wurde bei initialen Glucosekonzentrationen von 77 bis 97 g/L erreicht und lag bei 1,5 g/(L·h). Mit steigender initialer Glucosekonzentration nahm die Ausbeute und Produktivität ab (Tabelle 4.13).

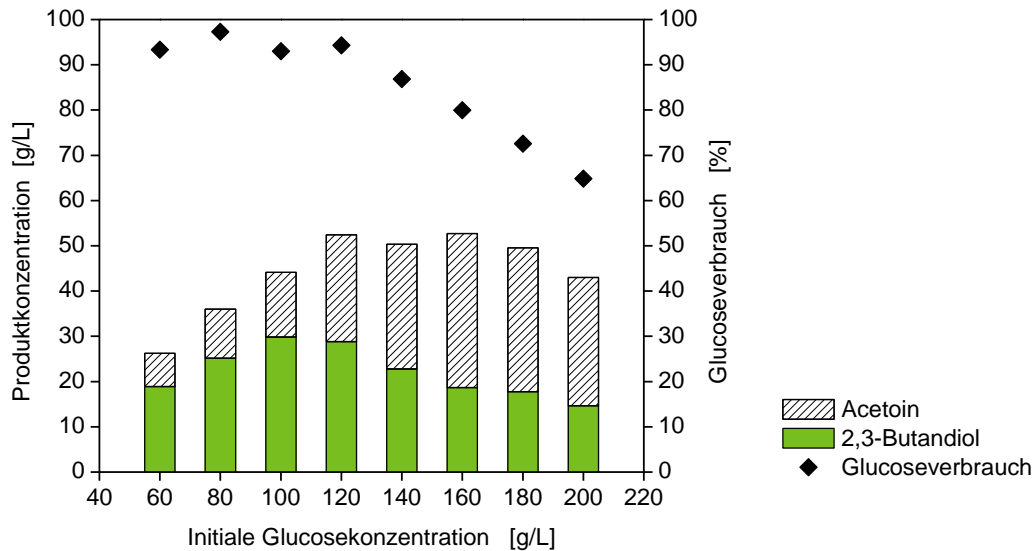


Abbildung 4.31: 2,3-BDO- und Acetoinkonzentration in Abhängigkeit der initialen Glucosekonzentration für den Stamm *B. atrophaeus* NRS-213. Kultivierung in einer 96-Well MTP bei 39 °C und 700 rpm.

B. mojavensis B-14698 konnte im Basal-HE-Medium nicht mehr als etwa 70 g/L Glucose verwerten, bevor die Kultivierung zum Erliegen kam. Die Produktbildung betrug dabei immer etwa 20 g/L, unabhängig von der initialen Glucosekonzentration (Daten nicht gezeigt). Die Versuchsreihe mit *B. mojavensis* B-14698 wurde daher in dem modifizierten Basal-HE-Medium für *B. mojavensis* (siehe Kapitel 3.3.9) durchgeführt. Der Stamm konnte in dem angepassten Medium die Glucose bis zu einer initialen Glucosekonzentration von 154 g/L vollständig verbrauchen (Abbildung 4.32). Es wurde eine maximale Produktkonzentration von 58,2 g/L (35,0 g/L 2,3-BDO und 23,2 g/L Acetoin) in dem Ansatz mit einer initialen Substratkonzentration von 139 g/L erreicht. Die Produktausbeute betrug bei diesem Ansatz 0,42 g/g nach einer Kultivierungsdauer von 60 h. Die höchste Produktivität betrug 1,5 g/(L·h) bei einer initialen Glucosekonzentration von 61 g/L. Die Produktivität und die Ausbeute nehmen mit zunehmender initialer Glucosekonzentration sukzessive ab (Tabelle 4.13). Mit einer Glucosestartkonzentration von 189 g/L lag die Produktivität nur noch bei 0,3 g/(L·h). Die Ausbeute sinkt von maximal 0,46 g/g bei 113 g/L Glucose auf 0,28 g/g bei einer initialen Glucosekonzentration von 189 g/L. Ab einer Glucosekonzentration über 139 g/L tritt zudem eine Verschiebung im 2,3-BDO-Acetoin-Verhältnis auf, hingehend zu einer höheren Acetoinproduktion (Tabelle 4.12). Der Zucker konnte ab einer initialen Glucosekonzentration von 173 g/L nicht mehr vollständig verwertet werden.

Das Kultivierungsverhalten von *B. atrophaeus* NRS-213 und *B. mojavensis* B-14698 bei unterschiedlichen initialen Glucosekonzentrationen ähnelt dem von *P. polymyxa* CICC 10010 (Jiang et al. 2015). Dieser Stamm konnte ebenfalls bis zu einer initialen Glucosekonzentration von 140 g/L gut 2,3-BDO und Acetoin produzieren. Auch die maximal erreichten Produktkonzentrationen liegen im selben Bereich von etwa 53 g/L 2,3-BDO und Acetoin. Der Referenzstamm *B. licheniformis* DSM 8785 hingegen toleriert Glucosekonzentrationen bis

180 g/L. Dabei erreichte der Stamm 78,0 g/L 2,3-BDO und Acetoin. Die Leistung des Referenzstammes ist damit höher, als die von *B. atrophaeus* NRS-213 und *B. mojavensis* B-14698. Insgesamt toleriert *B. atrophaeus* NRS-213 hohe Glucosekonzentrationen besser als *B. mojavensis* B-14698. Dies ist daran zu erkennen, dass mit zunehmender Glucosekonzentration die Produktbildung mit *B. mojavensis* B-14698 abnimmt, was ein Zeichen für eine Substratinhibierung ist. *B. atrophaeus* NRS-213 hingegen produziert ab ca. 120 g/L immer die gleichen Produktmengen. Dies spricht für eine Substanzlimitierung bzw. Produktinhibierung und nicht für eine Substratinhibierung.

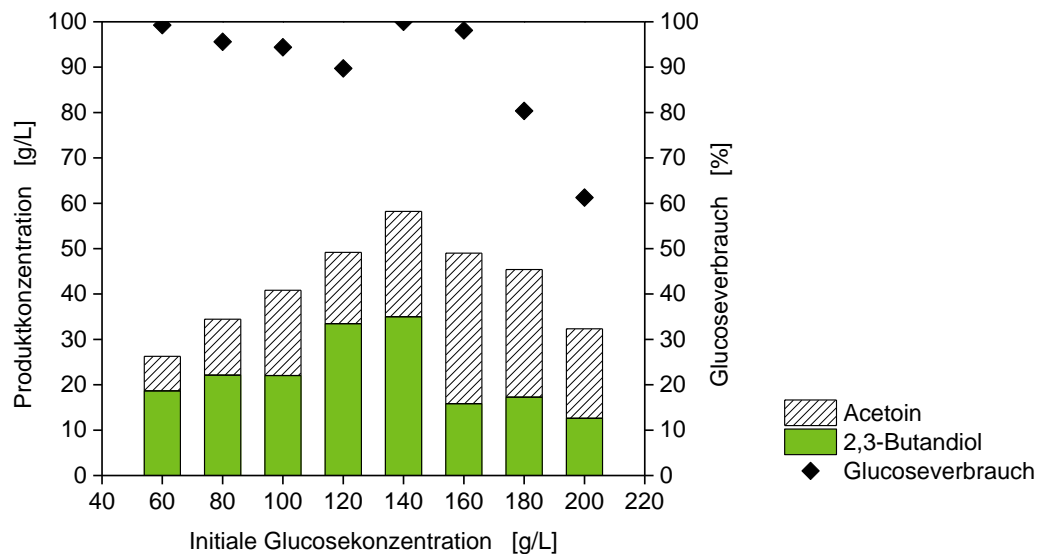


Abbildung 4.32: 2,3-BDO- und Acetoinkonzentration in Abhängigkeit der initialen Glucosekonzentration für den Stamm *B. mojavensis* B-14698. Kultivierung in einer 96-Well MTP bei 39 °C und 700 rpm in modifiziertem Basal-HE-Medium für *B. mojavensis* B-14698.

Tabelle 4.12: Verhältnis von Acetoin zu 2,3-BDO bei Kultivierungen mit unterschiedlichen initialen Glucosekonzentrationen mit *B. atrophaeus* NRS-213, *B. mojavensis* B-14698 und *B. vallismortis* B-14891. Kultivierung in 96-Well MTP bei 39 °C und 700 rpm.

Initiale Glucose- konzentration * [g/L]	<i>B. atrophaeus</i> NRS-213	<i>B. mojavensis</i> B-14698	<i>B. vallismortis</i> B-14891
	2,3-BDO : Acetoin [-]	2,3-BDO : Acetoin [-]	2,3-BDO : Acetoin [-]
60	2,6	2,4	5,2
80	2,3	1,8	2,0
100	2,1	1,2	5,7
120	1,2	2,1	5,5
140	0,8	1,5	3,1
160	0,5	0,5	3,4
180	0,6	0,6	3,5
200	0,5	0,6	3,3

* ungefähre Angaben

In Abbildung 4.33 ist die 2,3-BDO- und Acetoinproduktion in Abhängigkeit der initialen Glucosekonzentration mit dem Stamm *B. vallismortis* B-14891 dargestellt. Mit zunehmender initialer Glucosekonzentration steigt die 2,3-BDO-Endkonzentration. Der Zucker kann bis zu der getesteten Konzentration von 200 g/L vollständig verstoffwechselt werden. Die maximale Produktkonzentration lag bei 78,7 g/L (60,4 g/L 2,3-BDO und 18,3 g/L Acetoin) bei einer initialen Glucosekonzentration von 200 g/L. Mit einer initialen Substratkonzentration von 182 g/L wurden ebenfalls 78,7 g/L Produkt gebildet. Dies könnte darauf hindeuten, dass eine Produktsteigerung ab 182 g/L Glucose nicht möglich ist.

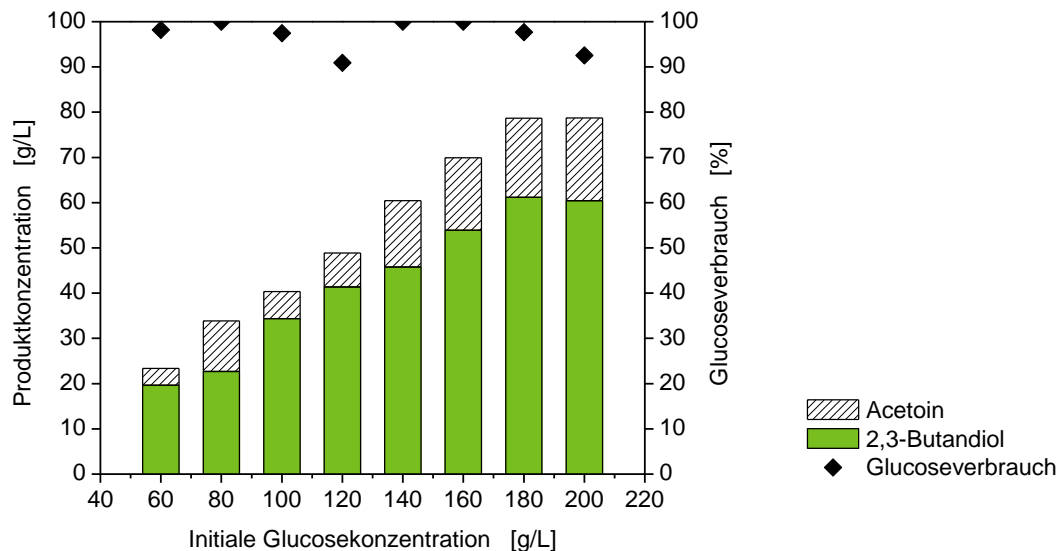


Abbildung 4.33: 2,3-BDO- und Acetoinkonzentration in Abhängigkeit der initialen Glucosekonzentration für den Stamm *B. vallismortis* B-14891. Kultivierung in einer 96-Well MTP bei 39 °C und 700 rpm.

Die Produktivität ist bis zu einer initialen Glucosekonzentration von 200 g/L relativ konstant (Tabelle 4.13). Die Produktivitäten liegen zwischen minimal 1,2 und maximal 1,9 g/(L·h). Auch die Ausbeute ist über den gesamten Bereich konstant. Bei einer initialen Glucosekonzentration von 200 g/L liegt die Produktausbeute noch bei 0,42 g/g (Tabelle 4.13). Dabei wurde in allen Ansätzen mehr 2,3-BDO als Acetoin gebildet (Tabelle 4.12). Der Stamm *B. vallismortis* ist in der Lage, hohe initiale Glucosekonzentrationen schnell zu 2,3-BDO umzusetzen und zeigt damit ein ähnliches Kultivierungsverhalten wie der Referenzstamm *B. licheniformis* DSM 8785 (vergl. Jurchescu et al. 2013).

Tabelle 4.13: Ausbeute und Produktivität bezogen auf die Produktbildung (2,3-BDO + Acetoin) bei Kultivierungen mit unterschiedlichen initialen Glucosekonzentrationen mit den Stämmen *B. atrophaeus* NRS-213, *B. mojavensis* B-14698 und *B. vallismortis* B-14891. Kultivierung in 96-Well MTP bei 39 °C und 700 rpm.

Initiale Glucose- konzentration	<u><i>B. atrophaeus</i> NRS-213</u>		<u><i>B. mojavensis</i> B-14698</u>		<u><i>B. vallismortis</i> B-14891</u>	
	Ausbeute [g/g]	Produktivität [g/(L·h)]	Ausbeute [g/g]	Produktivität [g/(L·h)]	Ausbeute [g/g]	Produktivität [g/(L·h)]
60	0,49	1,4	0,43	1,5	0,39	1,7
80	0,48	1,5	0,45	1,4	0,41	1,4
100	0,49	1,5	0,38	1,3	0,42	1,9
120	0,45	1,2	0,46	1,4	0,45	1,4
140	0,43	1,0	0,42	1,0	0,43	1,2
160	0,43	0,7	0,32	0,5	0,43	1,5
180	0,39	0,7	0,33	0,5	0,43	1,6
200	0,34	0,6	0,28	0,3	0,42	1,4

4.2.5 Zusammenfassung sekundäres Screening

Im sekundären Screening wurden die Stämme *B. atrophaeus* NRS-213, *B. mojavensis* B-14698 und *B. vallismortis* B-14891 eingehender untersucht und mit dem Referenzstamm *B. licheniformis* DSM 8785 verglichen. Es wurden verschiedene Hexosen, Pentosen, Disaccharide, Polysaccharide, Zuckersäuren und Glycerin als Substrat eingesetzt und die Produktbildung verglichen. Der Stamm *B. mojavensis* B-14698 setzte die wenigsten Substrate effizient zu 2,3-BDO und Acetoin um. Lediglich Inulin konnte dieser Stamm besser verwerten als die Vergleichsstämme. *B. atrophaeus* NRS-213 konnte etwa die Hälfte der Substrate verwerten. *B. licheniformis* DSM 8785 verwertete die meisten der angebotenen Substrate gut. Für 7 Substrate erreichte der Stamm die höchsten Produktausbeuten und Produktivitäten. *B. vallismortis* B-14891 konnte alle Substrate bis auf Inulin und Sorbose verwerten. Dabei erreichte der Stamm bei fast allen Substraten moderate bis gute Ausbeuten und Produktivitäten. Der Stamm weist insgesamt das breiteste Substratspektrum auf. Dies ist von großem Vorteil für den Einsatz von lignocellulosehaltigem Rohstoff als Substrat.

Ergänzend zum Substratscreening wurde die Verwertbarkeit von Xylan eingehender untersucht. Als Substrat wurden Mais-, Haferspелzen- und Buchenxylan eingesetzt. Die Xylane unterscheiden sich im Aufbau und der Molekülgröße. Maisxylan ist ein niedermolekulares Xylan und konnte von allen Stämmen, bis auf den Referenzstamm, verwertet werden. Ohne einen Enzymzusatz von Biogazyme 2x konnte das komplexere Haferspелzenxylan nur von dem Stamm *B. mojavensis* B-14698 zur 2,3-BDO- und Acetoinbildung genutzt werden. Durch den Zusatz von Biogazyme 2x waren auch die Stämme *B. atrophaeus* NRS-213 und *B. vallismortis* B-14891 in der Lage, das Haferspелzenxylan zu nutzen. *B. vallismortis* B-14891 war der einzige Stamm, der im SSF Ansatz mit Buchenxylan Produkt bildete. *B. licheniformis* DSM 8785 bildete in keinem Ansatz Produkt. Alle drei Screeningstämme eignen sich daher besser zur Nutzung von komplexen Substraten als der Referenzstamm.

B. mojavensis B-14698 nutzte die Komplexsubstrate am effizientesten und scheint über ein effektives Enzymsystem zur Hydrolyse von Polysacchariden zu verfügen. Die Versuchsreihen zeigen, dass die Kultivierungsbedingungen der Stämme zu sehr vom Arbeitsbereich der Enzyme abweichen, um einen effizienten SSF-Prozess zu betreiben.

Der letzte Schritt zur Bewertung der Screeningstämme war die Bestimmung der maximalen initialen Glucosekonzentration. Die maximale Glucosekonzentration für *B. atrophaeus* NRS-213 betrug 122 g/L. Mit steigender Glucosekonzentration sank das Verhältnis von 2,3-BDO zu Acetoin, wobei die Gesamtproduktmenge konstant blieb. *B. mojavensis* B-14698 kann bis zu einer Glucosekonzentration von 139 g/L für die 2,3-BDO Produktion eingesetzt werden. Mit steigender Konzentration ist der Stamm nicht mehr in der Lage, die Glucose vollständig zu verwerten. *B. vallismortis* B-14891 produzierte bis zur maximal getesteten Glucosekonzentration von 200 g/L, 2,3-BDO und Acetoin mit hohen Ausbeuten. Dabei wurde in allen Ansätzen mehr 2,3-BDO als Acetoin produziert.

In den Charakterisierungsuntersuchungen erzielte der Stamm *B. vallismortis* B-14891 gute Ergebnisse. Die Produktivitäten und Ausbeuten sind vergleichbar mit denen des Referenzstammes. Zur Nutzung von agrarischen Reststoffen, im speziellen von xylosehaltigen Hydrolysaten aus Holz, bietet *B. vallismortis* B-14891 jedoch viele Vorteile gegenüber dem Referenzstamm. Das breite Substratspektrum und die Fähigkeit auch komplexe Substrate im SSF zu verwerten, machen *B. vallismortis* B-14891 zu dem am besten geeigneten Kandidaten zur Produktion von 2,3-BDO aus lignocellulosehaltigem Material.

4.3 Medien- und Prozessoptimierung für *B. vallismortis* B-14891 mit Glucose als Kohlenstoffquelle

4.3.1 Bestimmung des Aminosäure- und Ionenbedarfs

Für die Charakterisierung von *B. vallismortis* B-14891 wurde untersucht, welche freien Aminosäuren und Ionen verwertet werden. Hierfür wurden zu verschiedenen Zeiten der Kultivierung Proben genommen und der Gehalt an freien Aminosäuren (Abbildung 4.35) und Ionen (Abbildung 4.37 und Abbildung 4.38) analysiert.

Abbildung 4.34 zeigt den Glucoseverbrauch und die Produktbildung zu der Kultivierung, die zur Ermittlung des Aminosäureverbrauchs genutzt wurde. Die Glucose wurde bereits innerhalb der ersten 5 h zu etwa 60 % verbraucht und es wurden 6,2 g/L 2,3-BDO und kein Acetoin gebildet. Die Nebenproduktkonzentration lag bei etwa 1,2 g/L. Nach 24 h war die Glucose vollständig verbraucht und die 2,3-BDO- und Acetoinkonzentration betrug 17,7 g/L.

Ergebnisse und Diskussion

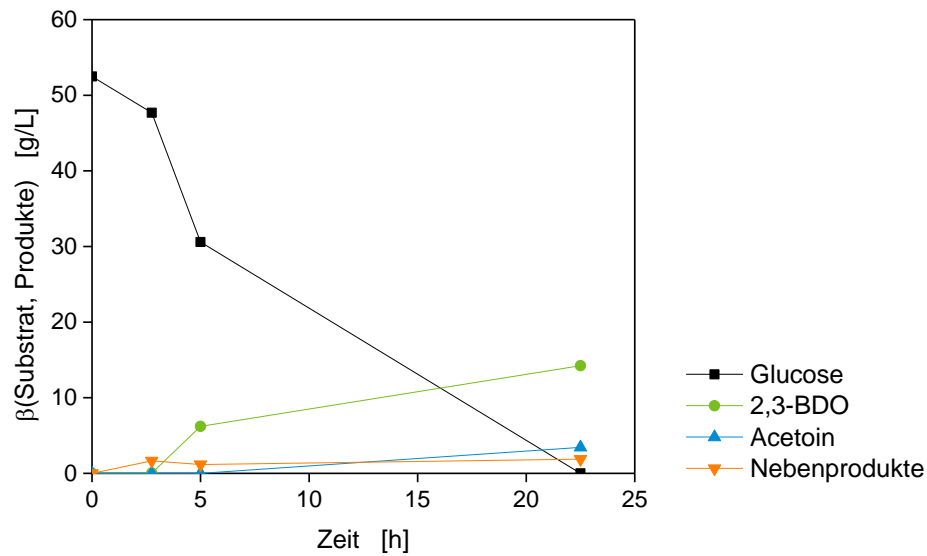


Abbildung 4.34: Produktbildung und Glucoseverbrauch von *B. vallismortis* B-14891 im Basal-HE-Medium mit ca. 50 g/L Glucose. Kultivierung in 96-Well MTP bei 39 °C und 700 rpm. Mittelwerte aus zwei Kultivierungen.

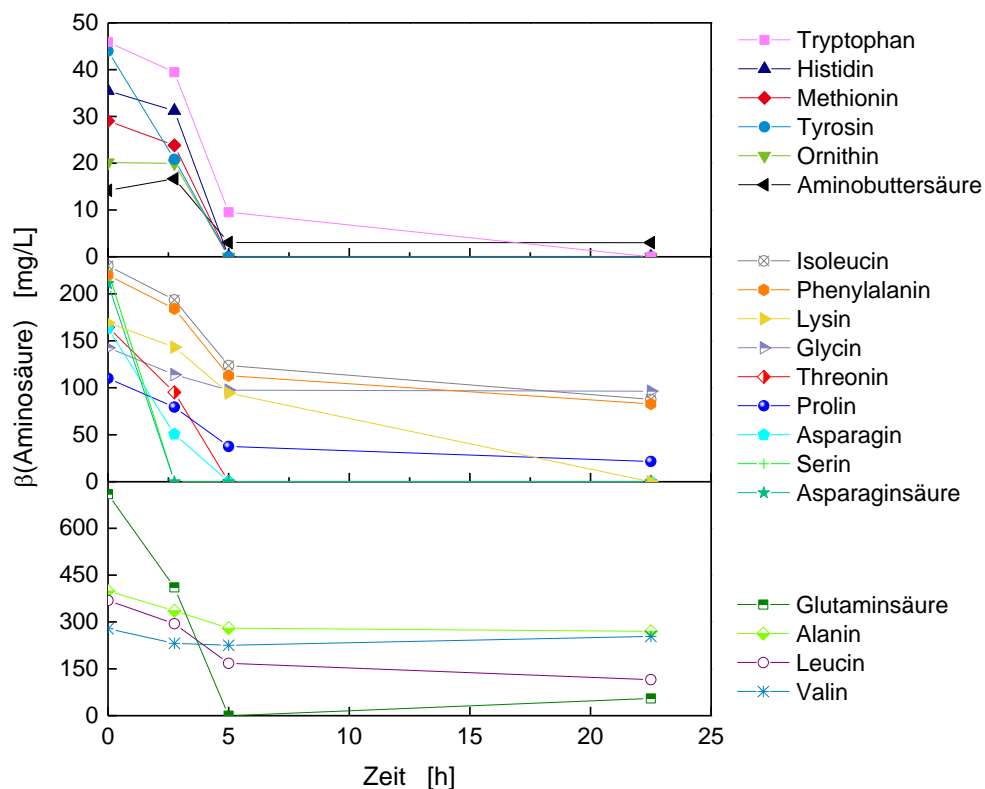


Abbildung 4.35: Aminosäureverbrauch von *B. vallismortis* B-14891 im Basal-HE-Medium und 50 g/L Glucose. Kultivierung in 24-Well MTP bei 39 °C und 320 rpm. Mittelwerte aus zwei Kultivierungen.

In der Kultivierung wurden die Aminosäuren Asparaginsäure, Serin und Glutaminsäure von *B. vallismortis* B-14891 zu Beginn der Fermentation bevorzugt verwertet (Abbildung 4.35). Nach etwa 3 h waren die Aminosäuren Asparaginsäure und Serin verbraucht. Ab dem Zeitpunkt, an dem Asparaginsäure und Serin verbraucht waren, wurden die Aminosäuren Aminobuttersäure, Histidin, Methionin, Ornithin und Tryptophan verwertet. Nach 5 h Kultivierung waren die Aminosäuren Aminobuttersäure, Glutaminsäure, Histidin, Methionin, Ornithin und Tryptophan verbraucht. Alanin, Valin, Isoleucin, Phenylalanin und Prolin wurden nur verwertet, solange essentielle Aminosäuren zur Verfügung standen. Nach 5 h waren die essentiellen Aminosäuren verbraucht und Alanin, Valin, Isoleucin, Phenylalanin und Prolin wurden nicht weiter verwertet. Leucin wurde bis zum Ende der Kultivierung verwertet, der Verbrauch war jedoch höher solange essentielle Aminosäuren zur Verfügung standen.

Zur Ermittlung des Verbrauches an freien Anionen und Kationen wurde eine Kultivierung im 250 mL Reaktorsystem mit etwa 200 g/L Glucose durchgeführt. Die Glucose wurde innerhalb von 56 h beinahe vollständig verwertet und dabei wurden 74,4 g/L 2,3-BDO und 25,2 g/L Acetoin gebildet (Abbildung 4.36).

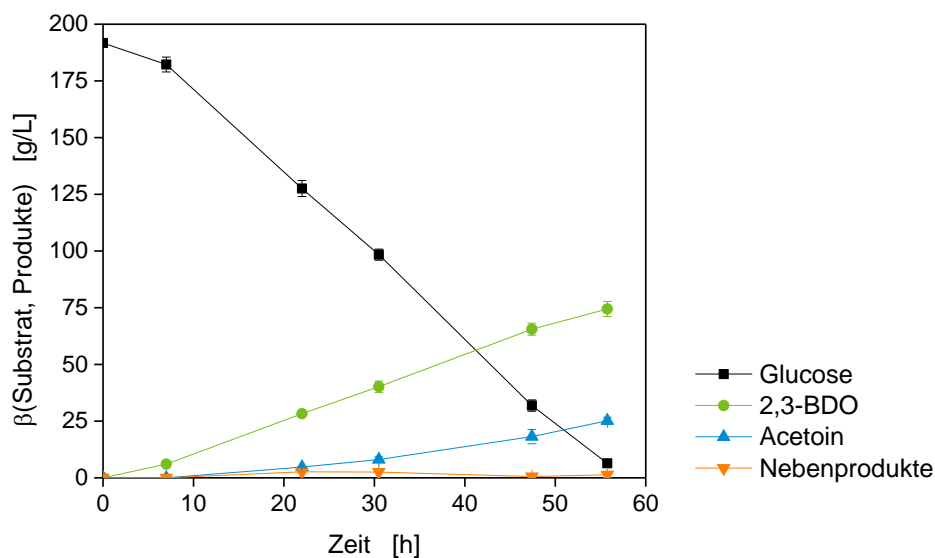


Abbildung 4.36: Kultivierung mit 200 g/L Glucose mit *B. vallismortis* B-14891. Kultivierung im 250 mL Reaktor mit einem Füllvolumen von 100 mL, einer Begasungsrate von 25 sL/h mit Luft, einer Rührerfrequenz von 600 rpm, einer freien Säuerung von 6,6 auf pH 5,0 und einer anschließenden pH-Endwertregelung bei pH 5,0 mit 2 M NaOH. Daten aus zwei Kultivierungen.

Die Analyse des Kationenverbrauchs zeigt, dass *B. vallismortis* B-14891 im Verlauf der Kultivierung die Kationen nicht verwertet (Abbildung 4.37). Die Aminosäureanalyse zeigt (Abbildung 4.35), dass *B. vallismortis* B-14891 bereits nach 24 h Kultivierung keine Aminosäuren bzw. keine essentiellen Aminosäuren mehr zur Verfügung stehen. Dennoch verwertet der Stamm nach 24 h Kultivierung kaum Ammonium als anorganische Stickstoffquelle. Erst nach einer Kultivierungszeit von ca. 48 h nahm die Ammoniumkonzentration geringfügig ab.

Ergebnisse und Diskussion

Auch die zur Verfügung stehenden Anionen wurden während der 55,75 h Kultivierung von *B. vallismortis* B-14891 nicht verwertet (Abbildung 4.38).

Die Analysen der Anionen und Kationen verdeutlichen, dass *B. vallismortis* B-14891 keine hohen Ansprüche an das Nährmedium stellt. Eine Reduzierung der Nährstoffe und eine damit einhergehende Preissenkung des Mediums, sind daher denkbar.

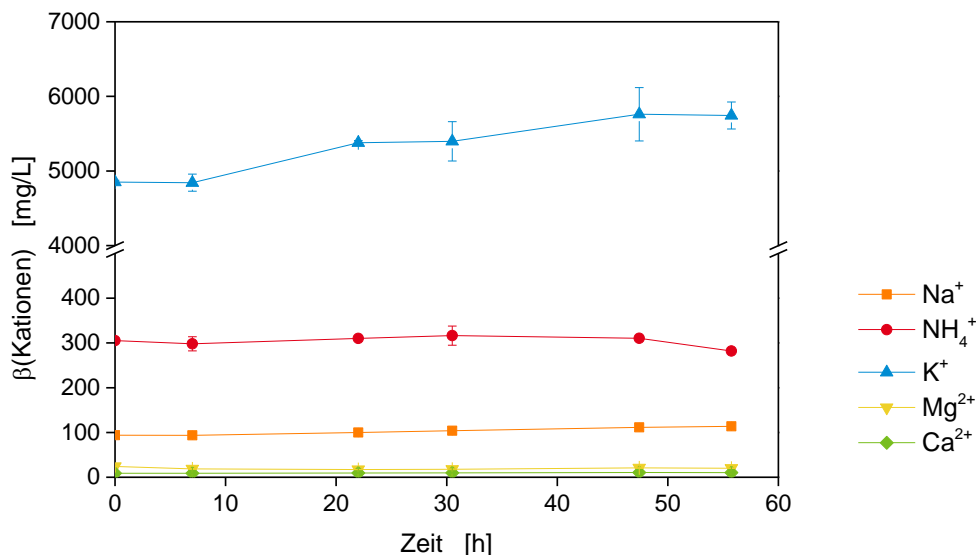


Abbildung 4.37: Kationenverbrauch von *B. vallismortis* B-14891. Kultivierung im 250 mL Reaktor mit 200 g/L Glucose, einem Füllvolumen von 100 mL, einer Begasungsrate von 25 sL/h mit Luft, einer Rührerfrequenz von 600 rpm, einer freien Säuerung von 6,6 auf pH 5,0 und einer anschließenden pH-Endwertregelung bei pH 5,0 mit 2 M NaOH. Daten aus zwei Kultivierungen.

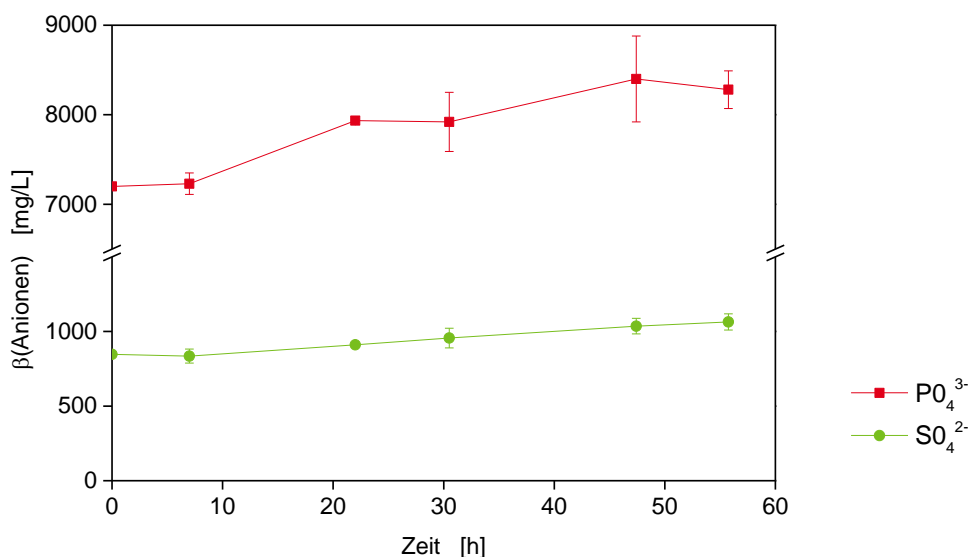


Abbildung 4.38: Anionenverbrauch von *B. vallismortis* B-14891. Kultivierung im 250 mL Reaktor mit 200 g/L Glucose, einem Füllvolumen von 100 mL, einer Begasungsrate von 25 sL/h mit Luft, einer Rührerfrequenz von 600 rpm, einer freien Säuerung von 6,6 auf pH 5,0 und einer anschließenden pH-Endwertregelung bei pH 5,0 mit 2 M NaOH. Daten aus zwei Kultivierungen.

4.3.2 Substitution von Hefeextrakt

Es konnte bereits gezeigt werden, dass *B. vallismortis* B-14891 in der Lage ist, ohne Zusatz von Hefeextrakt zu wachsen und 2,3-BDO zu produzieren (Kapitel 4.2.3). Ohne Hefeextraktzusatz sank jedoch die erreichte Produktendkonzentration. Es wurde daher der Einfluss verschiedener Stickstoffquellen und Supplines auf die Produktendkonzentration und die Produktivität von *B. vallismortis* B-14891 untersucht. Das Medium wurde mit 0,1 M MES gepuffert, um eine Versäuerung zu vermeiden. Die Kultivierungen mit 0 g/L, 1 g/L und 10 g/L Hefeextrakt dienten als Referenz.

4.3.2.1 Organische und anorganische Stickstoffquellen

Durch den Hefeextrakt wird der Organismus unter anderem mit Stickstoff versorgt. Im Folgenden wird der Einfluss von anorganischen und organischen Stickstoffquellen auf die Produktion von *B. vallismortis* B-14891 untersucht. Die Gesamtmenge an Stickstoff war in allen Ansätzen ohne Hefeextrakt gleich und bezog sich auf den Stickstoffgehalt in 10 g/L Hefeextrakt.

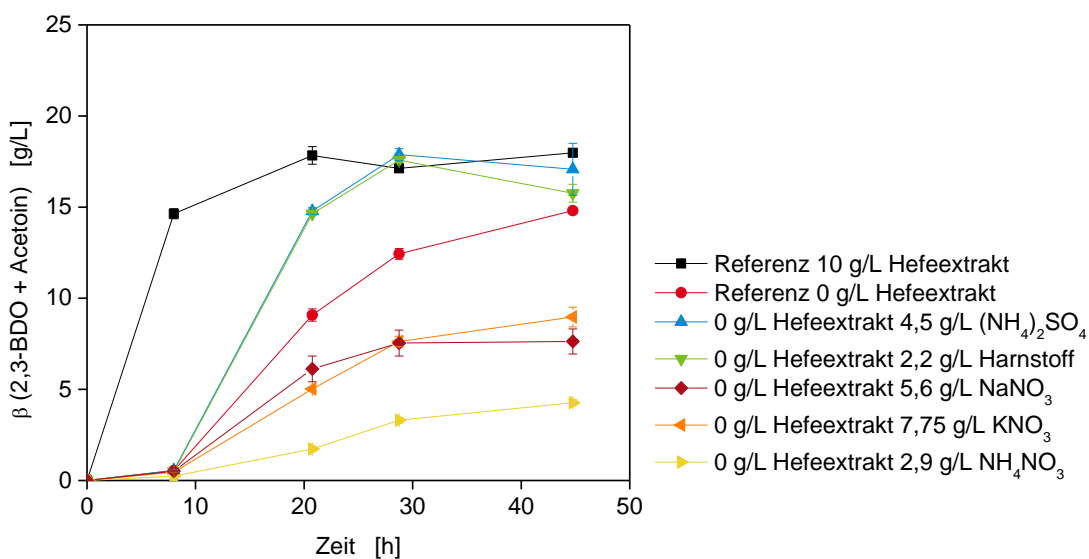


Abbildung 4.39: Produktbildung von *B. vallismortis* B-14891 mit verschiedenen organischen und anorganischen Stickstoffquellen ohne Hefeextraktzusatz. Kultivierung in einer 24-Well MTP mit einem Füllvolumen von 1 mL bei 37 °C, 320 rpm und einer initialen Glucosekonzentration von 50 g/L. Das Medium wurde mit 0,1 M MES bei einem Start-pH-Wert von $6,6 \pm 0,1$ gepuffert. Kultivierung im Doppelansatz.

In der Referenzkultivierung mit 10 g/L Hefeextrakt startet die Produktbildung nach kurzer Zeit (Abbildung 4.39). Nach 8 h Kultivierung wurden bereits 14,6 g/L 2,3-BDO und Acetoin gebildet. Nach 21 h wurde eine maximale Produktkonzentration von 17,8 g/L bei einem Substrattotalumsatz erreicht. Die Gesamtproduktivität lag bei 0,86 g/(L·h). In der Referenz ohne Hefeextrakt verlängerte sich die lag-Phase, wodurch die Produktbildung später einsetzte. Nach 8 h wurde noch kein Produkt gebildet. Nach 45 h wurden 14,8 g/L 2,3-BDO

und Acetoin gebildet, wobei das Substrat noch nicht vollständig verstoffwechselt war. Die Gesamtproduktivität verringerte sich auf 0,33 g/(L·h).

Der Zusatz von verschiedenen anorganischen und organischen Stickstoffquellen hatte einen Einfluss auf die erreichte Endproduktkonzentration und die Gesamtproduktivität, jedoch nur einen geringen Einfluss auf die lag-Phase. Bei allen Kultivierungen ohne Hefeextrakt betrug die lag-Phase mindestens 8 h. Die längeren lag-Phasen und die damit einhergehenden geringeren Produktivitäten könnten dadurch verursacht worden sein, dass die Vorkultur mit Hefeextrakt gewachsen war. Durch den Zusatz von Ammoniumsulfat oder Harnstoff wurden nach 29 h dieselben Mengen Produkt gebildet, wie in der 10 g/L Hefeextraktreferenz. In beiden Ansätzen konnte zudem die Gesamtproduktivität von 0,33 g/(L·h) ohne Hefeextrakt auf 0,62 g/(L·h) bzw. 0,61 g/(L·h) gesteigert werden. Mit dem Zusatz von Kaliumnitrat und Natriumnitrat sank die maximale Produktendkonzentration auf etwa 7,5 g/L nach 45 h. Es wurden somit 7,3 g/L weniger Produkt gebildet als in der 0 g/L Hefeextraktreferenz. Die geringste Produktbildung wurde durch den Zusatz von Ammoniumnitrat erreicht. Hier wurden nach 45 h Kultivierung lediglich 4,3 g/L 2,3-BDO und Acetoin gebildet. Nitrat scheint eine hemmende Wirkung auf *B. vallismortis* B-14891 zu haben.

In einem zweiten Ansatz wurden dem Medium 1 g/L Hefeextrakt und die verschiedenen Stickstoffquellen zugesetzt (Abbildung 4.40). In der Referenzkultivierung mit 1 g/L Hefeextrakt wurde nach 29 h 19,2 g/L 2,3-BDO und Acetoin gebildet. Mit 1 g/L Hefeextrakt lag die Gesamtproduktivität bei 0,67 g/(L·h) und war damit höher, als bei der Kultivierung ohne Hefeextrakt. Bei allen Kultivierungen mit 1 g/L Hefeextrakt verkürzte sich die lag-Phase gegenüber der 0 g/L Hefeextraktreferenz. Nach 8 h wurde in allen Ansätzen durchschnittlich 2,7 g/L Produkt gebildet.

Mit dem Zusatz von Harnstoff oder Ammoniumsulfat wurde nach 29 h 18,2 bzw. 19,0 g/L Produkt gebildet. Die Produktbildung konnte damit geringfügig, gegenüber der 10 g/L Referenz, gesteigert werden. Dies könnte an dem geringfügig höheren Stickstoffgehalt, der aus den 1 g/L Hefeextraktzusatz stammt, resultieren.

Bei den Kultivierungen mit Ammonium-, Natrium- und Kaliumnitrat hatte der Hefeextraktzusatz einen positiven Effekt auf die Produktbildung. In den Ansätzen wurden nach 45 h Kultivierung zwischen 9,5 und 12,6 g/L 2,3-BDO und Acetoin produziert. Ammoniumnitrat wirkte auf die Kultivierung ohne einen Hefeextraktzusatz stark hemmend. Durch die Zugabe von 1 g/L Hefeextrakt war die Hemmung weniger stark ausgeprägt. Allgemein hatte die Zugabe von Nitrat dennoch in allen Kultivierungen einen negativen Einfluss.

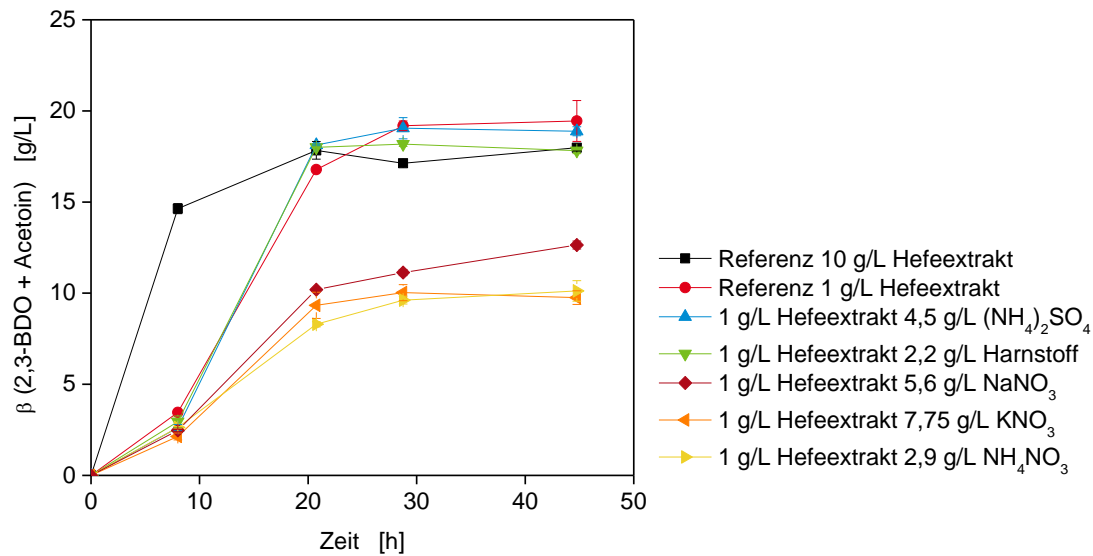


Abbildung 4.40: Produktbildung von *B. vallismortis* B-14891 mit verschiedenen organischen und anorganischen Stickstoffquellen und 1 g/L Hefeextrakt. Kultivierung in einer 24-Well MTP mit einem Füllvolumen von 1 mL bei 37 °C, 320 rpm und einer initialen Glucosekonzentration von 50 g/L. Das Medium wurde mit 0,1 M MES bei einem Start-pH-Wert von $6,6 \pm 0,1$ gepuffert. Kultivierung im Doppelansatz.

Die Substitution des Hefeextraktstickstoffs durch anorganische oder organische Stickstoffquellen ist möglich. Am besten eignen sich Ammoniumsulfat und Harnstoff. Ohne die Zugabe von Hefeextrakt und mit Ammoniumsulfat oder Harnstoff wurden dieselben Produktkonzentrationen erreicht, wie im Medium mit 10 g/L Hefeextrakt. Nitratsalze haben eine hemmende Wirkung auf den Stamm und eignen sich als anorganische Stickstoffquellen nicht. Insgesamt hat die Substitution einen negativen Einfluss auf die lag-Phase und die Gesamtproduktivität.

4.3.2.2 Zusatz von Ammoniumsulfat, Aminosäuren und Vitaminen

Wird der Stickstoff des Hefeextrakts durch Ammoniumsulfat oder Harnstoff ersetzt, verzögert sich die lag-Phase und die Gesamtproduktivität sinkt. Es wurde daher der Einfluss von Vitaminen und Aminosäuren, bei der Hefeextraktsubstitution mit Ammoniumsulfat, untersucht (Abbildung 4.41 und Abbildung 4.42). Die zugesetzten Mengen an Vitaminen und Aminosäuren richteten sich nach den Mengen, die in 10 g/L Hefeextrakt enthalten sind (siehe Kapitel 0).

Bei der Kultivierung ohne Hefeextrakt (Abbildung 4.41) und mit Zugabe von Ammoniumsulfat und Vitaminen stieg die maximale Produktendkonzentration gegenüber den beiden Referenzkultivierungen mit 10 g/L und ohne Hefeextrakt (Tabelle 4.14). Insgesamt wurden 18,8 g/L 2,3-BDO und Acetoin in 27 h produziert. Auf den Verzug der lag-Phase hat der Vitaminzusatz keinen Einfluss und die Produktion setzt, wie in der 0 g/L Hefeextraktreferenz, nach etwa 8 h ein. Die Gesamtproduktivität lag bei etwa 0,87 g/(L·h).

Ergebnisse und Diskussion

Durch den Zusatz von Ammoniumsulfat und Aminosäuren stieg die maximale Produktkonzentration als auch die Produktivität. Die Produktion setzte ohne eine ausgeprägte Verzögerung der lag-Phase ein. Nach 8 h wurden bereits 6,0 g/L 2,3-BDO und Acetoin produziert. Die maximale Produktkonzentration von 21,0 g/L wurde nach 47 h erreicht. Die Gesamtproduktivität lag bei etwa 0,96 g/(L·h).

Durch den Zusatz von Ammoniumsulfat und Aminosäuren konnte eine Steigerung der Produktivität, Ausbeute und des Endtitors gegenüber der 0 g/L Hefeextraktreferenz erzielt werden. Der Zusatz beider Wachstumsfaktoren, Aminosäuren und Vitamine, brachte keine weitere Verbesserung und der Endtiter sank gegenüber des Ansatzes mit Ammoniumsulfat und Aminosäuren. In dieser Versuchsreihe zeigt sich deutlich, dass Aminosäuren einen Einfluss auf die lag-Phase haben und dass Aminosäuren und Vitamine jeweils einen Einfluss auf den Produkttiter haben. Die Zugabe von Aminosäuren hat dabei den größeren positiven Einfluss auf die Kultivierung als die Vitaminzugabe. Dennoch wird nicht dieselbe Gesamtproduktivität von etwa 2 g/(L·h) erreicht, wie mit dem Einsatz von 10 g/L Hefeextrakt. Es sind somit noch weitere Suppline im Hefeextrakt enthalten, die einen Einfluss auf die Produktbildung von *B. vallismortis* B-14891 haben.

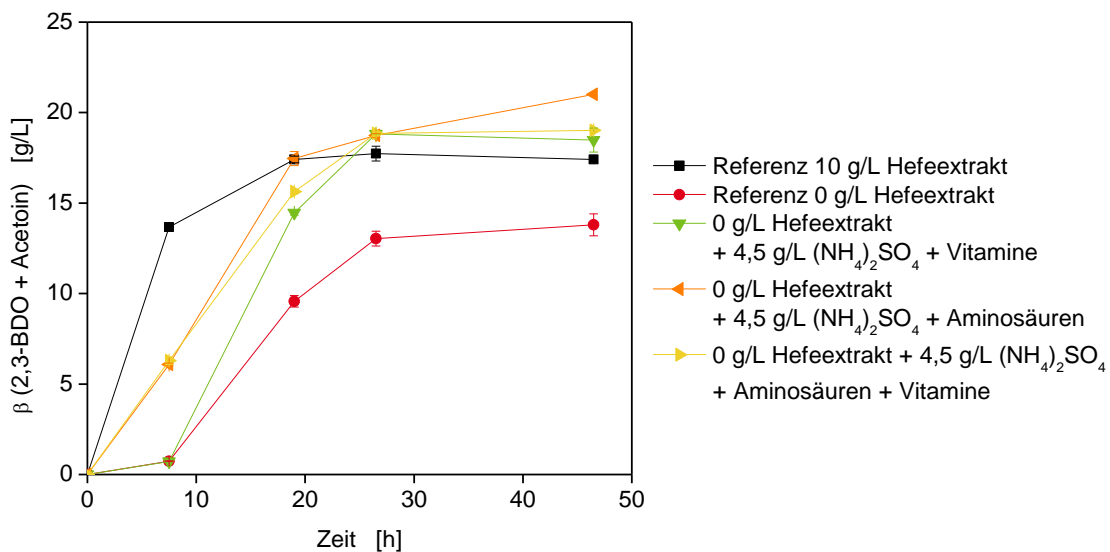


Abbildung 4.41: Produktbildung von *B. vallismortis* B-14891 ohne Hefeextrakt, mit Zusatz von Ammoniumsulfat, Aminosäuren (AS) und Vitaminen (Vit). Kultivierung in einer 24-Well MTP mit einem Füllvolumen von 1 mL bei 37 °C, 320 rpm und einer initialen Glucosekonzentration von 50 g/L. Das Medium wurde mit 0,1 M MES bei einem Start-pH-Wert von $6,6 \pm 0,1$ gepuffert. Kultivierung im Doppelansatz.

Die Kultivierungen wurden mit dem Zusatz von 1 g/L Hefeextrakt wiederholt (Abbildung 4.42). Die Verzögerung der lag-Phasen war in den Ansätzen mit 1 g/L Hefeextrakt und 1 g/L Hefeextrakt, Ammoniumsulfat und Vitaminen weniger ausgeprägt, als in den Vergleichskultivierungen ohne Hefeextrakt (vergl. Abbildung 4.41). Beide Ansätze verliefen nahezu parallel und erzielten Produktivitäten von etwa 1 g/(L·h). Die drei weiteren Ansätze, bei denen jeweils Aminosäuren zugesetzt wurden, verliefen ebenfalls parallel. Es wurden

Produktkonzentrationen von 18,7 – 20,0 g/L erreicht und Produktivitäten von 1,0 – 1,1 g/(L·h).

Der Ansatz mit Aminosäuren und Vitaminen verlief parallel zu dem Ansatz mit Aminosäuren, Vitaminen und Ammoniumsulfat. Die Zugabe der anorganischen Stickstoffquelle hatte keinen weiteren positiven Effekt, sobald die Suppline zugesetzt wurden.

In den Ansätzen mit 1 g/L Hefeextrakt, konnte durch die Zugabe von Aminosäuren der Endtiter gesteigert werden. Besonders positiv wirkte sich der Ansatz mit Ammoniumsulfat und Aminosäuren auf den Produkttiter und die Ausbeute aus. Gegenüber der 10 g/L Hefeextraktreferenz stieg die Ausbeute von 0,32 auf 0,36 g/g. Der Vitaminzusatz hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Kultivierungen.

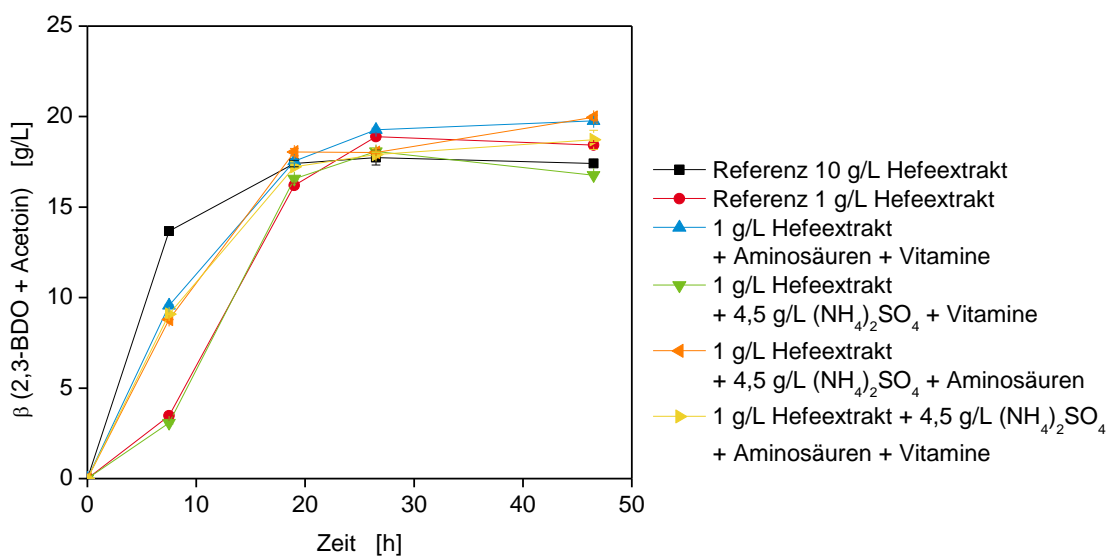


Abbildung 4.42: Produktbildung von *B. vallismortis* B-14891 mit Zusatz von Ammoniumsulfat, Aminosäuren (AS), Vitaminen (Vit) und 1 g/L Hefeextrakt. Kultivierung in einer 24-Well MTP mit einem Füllvolumen von 1 mL bei 37 °C, 320 rpm und einer initialen Glucosekonzentration von 50 g/L. Das Medium wurde mit 0,1 M MES bei einem Start-pH-Wert von $6,6 \pm 0,1$ gepuffert. Kultivierung im Doppelansatz.

Tabelle 4.14: Produktkonzentrationen (2,3-BDO + Acetoin) bei der Kultivierung von *B. vallismortis* B-14891 mit Ammoniumsulfat, Aminosäuren (AS) und Vitaminen (Vit). Kultivierung in 24-Well MTP bei 37 °C und 320 rpm. Kultivierungen im Doppelansatz.

Zusatz	<u>10 g/L Hefeextrakt</u>	<u>1 g/L Hefeextrakt</u>	<u>0 g/L Hefeextrakt</u>
	2,3-BDO + Acetoin [g/L]	2,3-BDO + Acetoin [g/L]	2,3-BDO + Acetoin [g/L]
Ohne Zusatz	17,7	18,9	0,66
Vit + AS	-	19,8	-
(NH ₄) ₂ SO ₄ + Vit	-	18,1	18,8
(NH ₄) ₂ SO ₄ + AS	-	20,0	21,0
(NH ₄) ₂ SO ₄ + Vit + AS	-	18,7	19,0

4.3.2.3 Einsatz alternativer Stickstoffquellen

B. vallismortis B-14891 ist für die Verwertung von Reststoffen ein vielversprechender Kandidat, da das Bakterium für das Wachstum und die 2,3-BDO-Produktion per se kein Hefeextrakt benötigt. Im folgenden Versuch wurden hydrolysiertes Rapsschrot und Proti Grain® als Komplexbestandteil, anstelle des Hefeextraktes, eingesetzt. Rapsschrot und Proti Grain® sind Substanzen aus der Agrarwirtschaft bzw. der Bioethanolherstellung. Sie stellen kostengünstige Reststoffe dar, die in großen Mengen zur Verfügung stehen. Sie liefern in hydrolysierter Form Stickstoff und Aminosäuren. Es wurde eine Versuchsreihe durchgeführt, in der die Ansätze mit Hefeextrakt, Proti Grain® und Rapsschrot dieselben Mengen an Stickstoff aufwiesen (Abbildung 4.43).

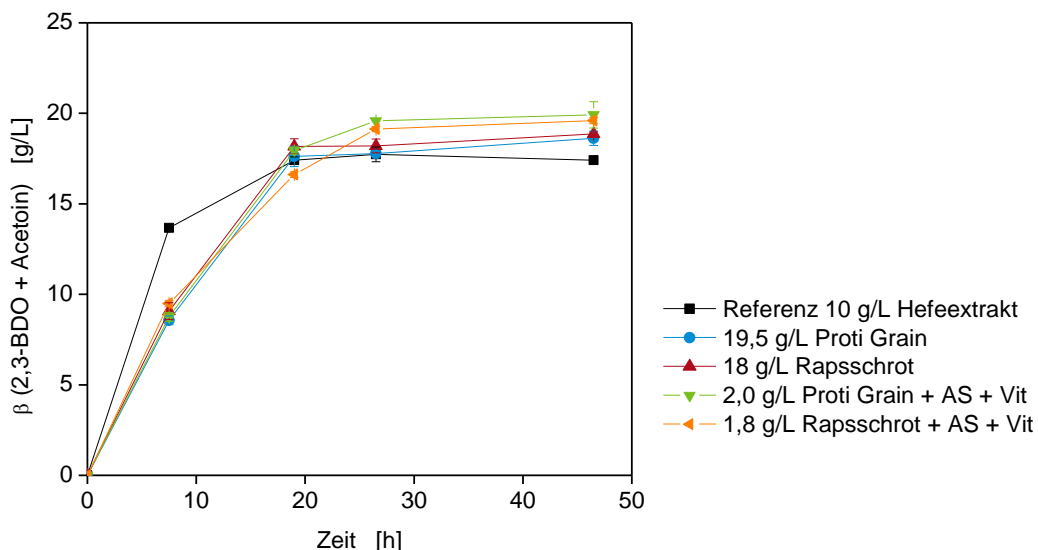


Abbildung 4.43: Produktbildung von *B. vallismortis* B-14891 mit Zusatz von hydrolysiertem Rapsschrot und Proti Grain® sowie mit reduziertem Rapsschrot und Proti Grain® mit Vitamin- (Vit) und Aminosäurezusatz (AS). Kultivierung in einer 24-Well MTP mit einem Füllvolumen von 1 mL bei 37 °C, 320 rpm und einer initialen Glucosekonzentration von 50 g/L. Kultivierung im Doppelansatz.

Die Kultivierungen zeigen, dass Rapsschrot und Proti Grain® eine potentielle Alternative zum herkömmlichen Hefeextrakt bilden (Abbildung 4.43). Mit beiden Komplexbestandteilen setzte die 2,3-BDO-Produktion direkt nach der Inokulation ein. Die Kultivierungen liefen dabei nahezu parallel ab. Nach 8 h wurden bereits 8,5 – 9,5 g/L 2,3-BDO und Acetoin gebildet. In der Referenzkultivierung war die Produktbildung zu diesem Zeitpunkt höher und lag bei 13,7 g/L 2,3-BDO und Acetoin. Nach 27 h wurde mit Rapsschrot und Proti Grain® eine maximale Endproduktkonzentration von 17,8 – 18,2 g/L erreicht. Der Produkttiter war geringfügig höher als im 10 g/L Hefeextraktreferenzversuch, bei dem 17,7 g/L 2,3-BDO und Acetoin produziert wurden (Tabelle 4.15).

In zwei weiteren Ansätzen wurde die Menge der Reststoffe um ein zehnfaches reduziert und entsprechend den Mengen von 10 g/L Hefeextrakt Aminosäuren und Vitamine zugesetzt. Die Ansätze verliefen innerhalb der ersten 8 h parallel zu den Ansätzen mit 19,5 g/L Proti Grain® und 18 g/L Rapsschrot. Die maximale Endproduktkonzentration war in beiden Ansätzen mit reduziertem Rohstoffeinsatz nach 27 h höher. Es wurden 19,3 – 19,6 g/L 2,3-BDO und Acetoin gebildet.

In den Ansätzen mit Rapsschrot und Proti Grain® wurden höhere Ausbeuten erzielt als in der Hefeextraktreferenz, die Produktivitäten waren dabei geringfügig kleiner (Tabelle 4.15). In den Ansätzen mit reduziertem Komplexbestandteil mit Aminosäuren und Vitaminen betrug die Ausbeute 0,35 - 0,36 g/g. Im Referenzversuch lag die Ausbeute bei 0,33 g/g. Hydrolysiertes Rapsschrot und Proti Grain® stellen interessante und effiziente Alternativen zum Hefeextrakt dar.

Tabelle 4.15: Produktivitäten (P) nach 8 h und maximale Produktkonzentrationen (2,3-BDO und Acetoin) bei der Kultivierung von *B. vallismortis* B-14891 mit Rapsschrot und Proti Grain® sowie mit reduziertem Rapsschrot und Proti Grain® mit Vitamin- und Aminosäurezusatz. Die eingesetzten Mengen beziehen sich jeweils auf den Stickstoffgehalt in 10 g/L bzw. 1 g/L Hefeextrakt. Kultivierung in 24-Well MTP bei 37 °C, 320 rpm und 1 mL Füllvolumen. Kultivierungen im Doppelansatz.

Zusatz	<u>10 g/L Hefeextrakt</u>		<u>Proti Grain®</u>		<u>Rapsschrot</u>	
	P 8 h [g/(L·h)]	max. Produkt [g/L]	P 8 h [g/(L·h)]	max. Produkt [g/L]	P 8 h [g/(L·h)]	max. Produkt [g/L]
Stickstoffgehalt entspricht 10 g/L Hefeextrakt	1,70	17,7	1,02	17,8	1,11	18,2
Stickstoffgehalt entspricht 1 g/L Hefeextrakt mit Aminosäure- und Vitaminzusatz	-	-	1,08	19,6	1,19	19,3

4.3.3 Einfluss einer pH-Endwertregelung im Bioreaktor

Der pH-Wert hat einen entscheidenden Einfluss auf die Bildung der verschiedenen Metaboliten der gemischten Säurefermentation. Der optimale Kultivierungs-pH-Wert zur Bildung von 2,3-BDO ist stammspezifisch und muss für jeden Stamm individuell bestimmt werden. In der Literatur finden sich keine Daten für den Stamm *B. vallismortis* B-14891 als 2,3-BDO-Produktionsstamm.

Die Kultivierungen zur pH-Endwertregelung mit dem Substrat Glucose wurden in einem DASbox®-Fermentersystem durchgeführt. Für alle Kultivierungen von *B. vallismortis* B-14891 im Reaktorsystem und außerhalb von Screeningversuchen wurde eine Kultivierungstemperatur von 37 °C verwendet. Der Start-pH-Wert im Basal-HE-Medium wurde auf $6,6 \pm 0,1$ eingestellt und schließlich eine freie Säuerung bis zu einem bestimmten pH-Endwert zugelassen. Die Regelung erfolgte mit einer 2 M NaOH-Lösung. Dabei wurde nur das weitere Absinken des pH-Wertes, nicht aber ein Anstieg, verhindert. Mit dem Substrat Glucose wurde die pH-Endwertregelung von 5,0 bis pH 6,4 in aufsteigenden Einheiten von 0,2 variiert. Zusätzlich erfolgte eine Kultivierung ohne pH-Wertregelung (Abbildung 4.44). Die Probenahmen zur Bestimmung der Produkte erfolgte mit Eintritt der Glucoselimitierung bzw. bis maximal 3 h nach Eintritt der Limitierung (Tabelle 4.16).

Da die Zeitpunkte der Glucoselimitierungen mit den offline Probenahmen nicht genau erfasst werden kann, wurden die Zeitpunkte mittels der online Abgasanalytik über die CTR ermittelt.

Tabelle 4.16: Probenahmezeitpunkte und Zeitpunkte der Glucoselimitierung (ermittelt über die online CTR) für die pH-Endwertreglungen mit *B. vallismortis* B-14891 mit Glucose als einzige Kohlenstoffquelle.

pH-Endwert- regelung [-]	Probenahme- zeitpunkt [h]	Eintritt der Glucoselimitierung [h]
4,8*	21,5	18,4
5,0	15,5	14,6
5,2	20,5	19,8
5,4	17,5	16,3
5,6	17,5	17,1
5,8	13,8	14,0
6,0	13,8	13,3
6,2	13,8	12,8
6,4	13,8	12,3

* ohne pH-Wertregelung

Die Variation der pH-Endwertregelung zeigt einen Einfluss auf die Bildung der Produkte, sowie auf die Geschwindigkeit der Glucoseverwertung. Mit zunehmenden pH-Endwerten

wird die Glucose effizienter abgebaut. Die pH-Werte können in zwei Gruppen eingeordnet werden:

- 1) $\text{pH} \geq 5,8$ es findet keine pH-Wert abhängige Umstellung auf den 2,3-BDO-Metabolismus statt.
- 2) $\text{pH} < 5,8$ es findet eine pH-Wert abhängige Umstellung auf den 2,3-BDO-Stoffwechselweg statt. Durch die Umstellung des Metabolismus kommt es unter anderem zu einer Verzögerung im Glucoseabbau.

Die Umstellung auf den 2,3-BDO-Stoffwechselweg, ist in Abbildung 4.44 zu erkennen. Mit zunehmendem pH-Wert nimmt die Bildung von organischen Säuren zu. Im sauren Bereich wird vermehrt 2,3-BDO produziert und die Bildung von Nebenprodukten vermindert. Hierbei ist eine kritische Grenze bei dem pH-Wert von 5,6 zu erkennen. Unterhalb eines pH-Wertes von 5,6 steigt die 2,3-BDO-Konzentration auf 34,7 – 36,1 g/L, oberhalb von 5,6 sinkt die 2,3-BDO-Konzentration auf unter 26,5 g/L und erreicht ein Minimum von 25,0 g/L bei einem pH-Wert von 6,4. Das Maximum in der 2,3-BDO-Produktion liegt bei 36,1 g/L bei einem pH-Wert von 5,4. Bei den pH-Werten 5,0 und 5,2 werden ähnlich hohe 2,3-BDO-Konzentrationen erreicht, wobei bei einem pH-Wert von 5,2 die geringste Nebenproduktkonzentration von 6,8 g/L erreicht wird. Sobald der pH-Wert unterhalb von 5,6 liegt, werden hohe 2,3-BDO- und Acetoin-Konzentration, bei Produktausbeuten von 0,41 – 0,46 g/g, erreicht. Bei einem unregulierten pH-Wert sinkt der pH-Wert auf minimal 4,8. Dabei wurden 34,7 g/L 2,3-BDO und 7,0 g/L Acetoin gebildet.

Im Zuge der Kultivierungen mit pH-Endwertregelung werden verschiedene Nebenprodukte der gemischten Säurefermentation gebildet. Glycerin wird als einziges mögliches Nebenprodukt zu keiner Zeit gebildet. Das Hauptnebenprodukt im zunehmenden neutralen pH-Bereich ist Lactat. Die maximale Lactatkonzentration von 15,8 g/L wird bei einem pH-Wert von 6,4 gebildet. Im sauren Bereich entsteht hingegen wenig bis kein Lactat. Succinat wird ebenfalls verstärkt im zunehmenden neutralen pH-Bereich gebildet und steigt von 3 g/L auf maximal 9,9 g/L. Die Nebenprodukte Acetat und Ethanol erreichen in allen Kultivierungen einen relativ konstanten Wert von 1,3 – 3,0 g/L und 1,6 – 3,9 g/L.

Die Nebenproduktkonzentration steigt mit zunehmendem pH-Wert von 5,2 auf 6,4 um den Faktor 4,6. Umgekehrt steigt die 2,3-BDO-Konzentration mit sinkendem pH-Wert, von 6,4 auf 5,4, um den Faktor 1,4. Es ist anzunehmen, dass mit pH-Werten oberhalb von pH 6,4, die Nebenproduktkonzentration weiter steigt.

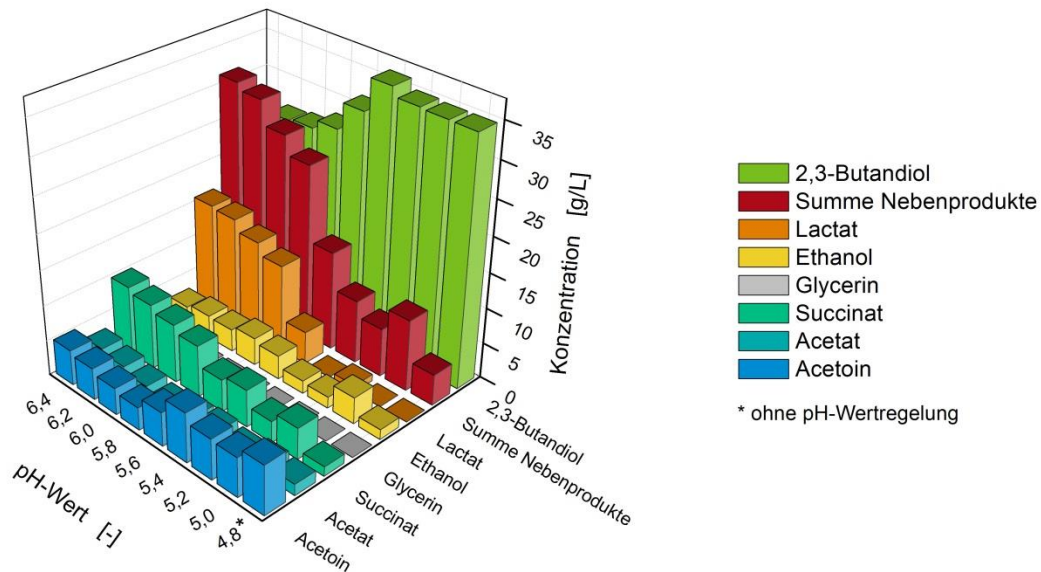


Abbildung 4.44: Nebenproduktspektrum von *B. vallismortis* B-14891 in Abhängigkeit der pH-Endwertregelung bei der Kultivierung mit Glucose. Kultivierung im 250 mL Reaktor mit einem Füllvolumen von 100 mL, einer Begasungsrate von 25 sL/h mit Luft, einer Rührerfrequenz von 600 rpm und einem Start-pH-Wert von $6,6 \pm 0,1$. Die pH-Regelung setzte bei Erreichen eines bestimmten pH-Wertes ein, wobei durch 2 M NaOH ein weiteres Absinken des pH-Wertes verhindert wurde. Die Probenahme erfolgte jeweils nach Eintritt der Glucoselimitierung. Die Summe der Nebenprodukte fasst die Bildung von Acetat, Succinat, Glycerin, Ethanol und Lactat zusammen.

4.3.4 Einfluss des Sauerstoffeintrages

Die 2,3-BDO- und Acetoinbildung von *B. vallismortis* B-14891 in Abhängigkeit des Sauerstoffgehaltes wurde in einem DASbox®-Bioreaktorsystem untersucht. Hierfür wurden 24 Kultivierungen bei unterschiedlicher Rührerdrehzahl (500, 600, 700 und 800 rpm) und unterschiedlichem Sauerstoffgehalt (5, 10, 15, 21, 25 und 30 % O₂) im konstanten Begasungsstrom von 25 sL/h durchgeführt (Abbildung 4.45).

In allen Kultivierungen sank der Gelöstsauerstoff innerhalb von 2 – 4 h auf 0 %. Somit lagen in allen Kultivierungen sauerstofflimitierende Bedingungen vor. Bei einer Rührerfrequenz von 500 rpm und 5 % O₂ im Begasungsstrom werden die geringsten Mengen an 2,3-BDO und Acetoin, 30,2 g/L innerhalb von 46 h, produziert. Mit steigendem Sauerstoffgehalt im Begasungsstrom steigt der Anteil an gebildetem 2,3-BDO und Acetoin. Mit steigender Rührerfrequenz bildet sich das Maximum der Produkte bei geringeren Sauerstoffgehalten im Begasungsstrom aus. Die höchsten Produktkonzentrationen von 41,5 g/L und 42,1 g/L werden bei den Bedingungen 500 rpm und 30 % O₂ nach 25,5 h sowie bei 800 rpm und 21 % O₂ nach 21,5 h gebildet. Die 2,3-BDO- und Acetoinausbeute liegt bei 0,45 g/g und somit nahe am theoretischen Maximum von 0,5 g/g. Bei Rührerfrequenzen ab 700 rpm und 30 % O₂ im Begasungsstrom sinkt die 2,3-BDO- und Acetoinkonzentration signifikant.

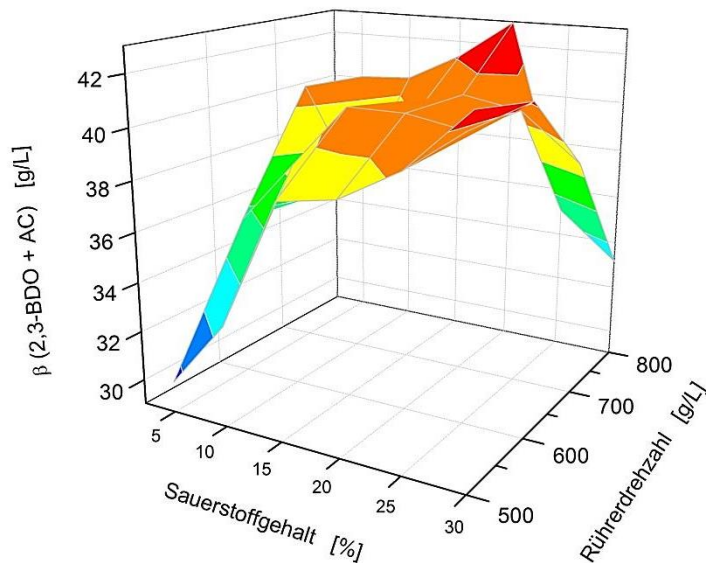


Abbildung 4.45: 2,3-BDO- und Acetoinkonzentration bei Eintritt in die Glucoselimitierung. Kultivierung von *B. vallismortis* B-14891 im 250 mL Reaktor mit einem Füllvolumen von 100 mL, einer Begasungsrate von 25 sL/h, einem Sauerstoffgehalt von 5 – 30 %, einer Rührerfrequenz von 500 – 800 rpm, einem Start-pH-Wert von $6,6 \pm 0,1$ und einer freien Säuerung bis pH 5,0. Die Initiale Glucosekonzentration betrug 100 g/L.

Neben einer hohen Endkonzentration ist auch die Produktivität ein entscheidender Faktor für einen effizienten Prozess. In Abbildung 4.46 ist die Dauer bis zum Eintritt der Glucoselimitierung in den einzelnen Kultivierungen dargestellt. Die Zeitpunkte der Limitierungen wurden wieder mittels der online Abgasanalytik über die CTR ermittelt.

Bei den Bedingungen 5 % O₂ und 500 rpm sowie 30 % O₂ und 800 rpm kam die Kultivierung zum Erliegen, bevor die 100 g/L Glucose vollständig verbraucht waren.

Der schnellste Totalumsatz der Glucose wurde bei den Bedingungen 21 % und 25 % O₂ und 700 rpm erreicht. Die Umsetzung erfolgte innerhalb von 14 – 14,5 h. Bezogen auf die Produktkonzentration von 2,3-BDO und Acetoin nach 21,5 h, errechnen sich für beide Kultivierungen Produktivitäten von 2,8 g/(L·h).

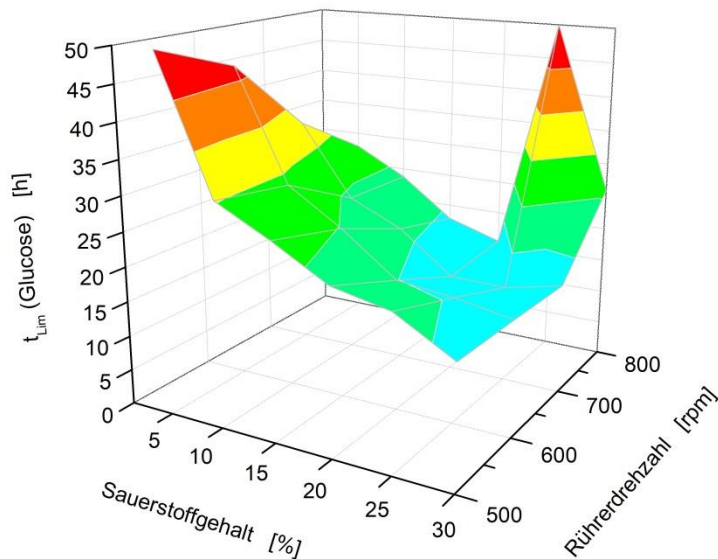


Abbildung 4.46: Dauer bis zur Glucoselimitierung ($t_{\text{Lim}} (\text{Glucose})$) in Abhängigkeit des Sauerstoffgehaltes und der Rührerdrehzahl. Kultivierung von *B. vallismortis* B-14891 im 250 mL Reaktor mit einem Füllvolumen von 100 mL, einer Begasungsrate von 25 sL/h, einem Sauerstoffgehalt von 5 – 30 %, einer Rührerfrequenz von 500 – 800 rpm und einem Start-pH-Wert von $6,6 \pm 0,1$. Die initiale Glucosekonzentration betrug 100 g/L. In den roten Bereichen konnte die Glucose innerhalb von 48 h nicht vollständig verstoffwechselt werden.

Die Summe der gebildeten Nebenprodukte ist abhängig von der Sauerstoffversorgung. Bei den verschiedenen Kultivierungen bildet sich daher das Minimum der Nebenprodukte bei unterschiedlichen Rührerfrequenzen und O_2 -gehalten aus. Bei den unterschiedlichen Rührerfrequenzen werden im Bereich zwischen 15 und 21 % O_2 jeweils die geringsten Mengen an Nebenprodukten gebildet (Abbildung 4.47).

In Tabelle 4.17 ist exemplarisch für eine niedrige, mittlere und hohe Sauerstoffversorgung die Verteilung der Nebenprodukte dargestellt. Die Kultivierung mit einer mittleren Sauerstoffversorgung (600 rpm und 21 % O_2) zeigt, dass hier der meiste Kohlenstoff in den 2,3-BDO-Stoffwechselweg geschleust wird. Es wurden 32,5 g/L 2,3-BDO und 8,1 g/L Acetoin gebildet. Neben den Hauptprodukten (2,3-BDO und Acetoin) wurden zusätzlich 1,6 g/L Acetat und 2,0 g/L Succinat produziert. In allen Ansätzen ist die Biomassebildung relativ hoch und mit steigender Sauerstoffverfügbarkeit steigt die Biomassebildung.

Bei einer relativ niedrigen Sauerstoffversorgung (500 rpm und 5 % O_2) wurde neben 2,3-BDO und Acetoin noch Lactat und Succinat gebildet. In dieser Kultivierung war Lactat das Hauptnebenprodukt mit 8,3 g/L. In der Literatur wird beschrieben, dass bei anoxischen und microaeroben Bedingungen verstärkt Ethanol oder Succinat von Bakterien mit einer gemischten Säurefermentation produziert wird (Zeng et al. 1994, Teixeira de Mattos und Tempest 1983). Dies ist nötig, um die Reduktionsäquivalente, die bei der 2,3-BDO-Produktion entstehen, auszugleichen. *B. vallismortis* B-14891 hingegen produziert bei sauerstofflimitierten Bedingungen nur geringe Mengen an Succinat und kein Ethanol. Das Hauptnebenprodukt ist Lactat. Durch das Einschlagen des Lactatstoffwechselweges können

die entstehenden Reduktionsäquivalente aus dem 2,3-BDO-Stoffwechselweg nicht abgefangen werden. Daher kam die Kultivierung vermutlich zum Erliegen, bevor das Substrat verbraucht war.

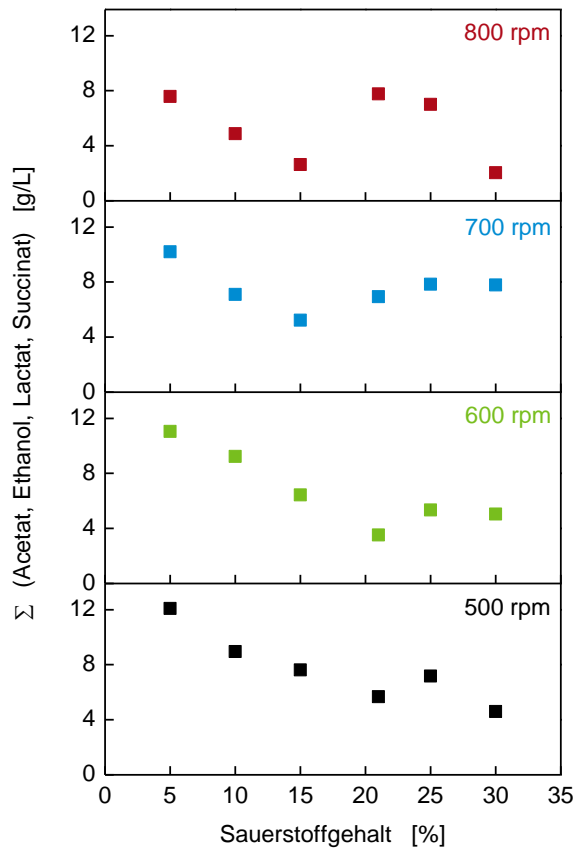


Abbildung 4.47: Summe der gebildeten Nebenprodukte (Acetat, Ethanol, Lactat und Succinat) von *B. vallismortis* B-14891 nach 21,5 h Kultivierung in Abhängigkeit der Rührerdrehzahl und des Sauerstoffgehalts der Zuluft. Kultivierung im 250 mL Reaktor mit einem Füllvolumen von 100 mL, einer Begasungsrate von 25 sL/h, einem Sauerstoffgehalt von 5 – 30 %, einer Rührerfrequenz von 500 – 800 rpm und einem Start-pH-Wert von $6,6 \pm 0,1$. Die initiale Glucosekonzentration betrug 100 g/L.

Tabelle 4.17: Produktverteilung von *B. vallismortis* B-14891 bei 500 rpm/5 % O₂, 600 rpm/21 % O₂ und 800 rpm/30 % O₂ nach 21,5 h Kultivierungsdauer. Kultivierung im 250 mL Reaktor mit einem Füllvolumen von 100 mL, einer Begasungsrate von 25 sL/h und einem Start-pH-Wert von 6,6 ± 0,1. Die initiale Glucosekonzentration betrug 100 g/L.

Produkt	Produktkonzentration	Produktkonzentration	Produktkonzentration
	500 rpm; 5 % O ₂	600 rpm; 21 % O ₂	800 rpm; 25 % O ₂
	[g/L]	[g/L]	[g/L]
2,3-Butandiol	20,4	32,5	30,1
Acetoin	2,8	8,1	5,0
Acetat	0,0	1,6	4,7
Lactat	8,3	0,0	0,0
Ethanol	0,0	0,0	0,0
Succinat	2,6	2,0	2,3
Biomasse	6,1	5,9	7,7

Unabhängig von der Sauerstoffverfügbarkeit war 2,3-BDO in allen Kultivierungen das Hauptprodukt. Das Verhältnis von Acetoin zu 2,3-BDO lag zwischen 0,15 und 0,39. Die Menge an gebildetem Acetoin war relativ konstant und änderte sich kaum mit zunehmender Sauerstoffverfügbarkeit. Die Produktverteilung von *B. vallismortis* B-14891 unterscheidet sich dahingehend maßgeblich von der Produktverteilung von *P. polymyxa* (vergl. Kapitel 2.1.5). Die relativ hohe Biomassebildung (vergl. Tabelle 4.17) von *B. vallismortis* B-14891 spricht für eine hohe TCA-Aktivität, auch bei niedriger Sauerstoffverfügbarkeit.

4.3.5 Einfluss des Sauerstoffgehaltes bei hohen Glucosekonzentrationen

Die Kultivierungsparameter 600 rpm und 21 % O₂ sowie 700 rpm und 21 % O₂ sind für die Kultivierung von *B. vallismortis* B-14891 geeignet. Sie führen zu hohen Produktausbeuten, Produktivitäten und sind kosteneffizient, da mit Luftsauerstoff begast werden kann. Die Ausbeuten von 2,3-BDO und Acetoin lagen mit 0,42 und 0,44 g/g in beiden Kultivierungen nahe am theoretischen Maximum. Beide Ansätze wiesen zusätzlich eine hohe Produktivität von 1,5 g/(L·h) auf und in beiden Kultivierungen wurden nur geringe Mengen an Nebenprodukten produziert. Um die Kultivierungsparameter zu verifizieren, wurden weitere Kultivierungen mit 200 g/L Glucose durchgeführt.

Die Abbildung 4.48 und Abbildung 4.49 zeigen den Kultivierungsverlauf von *B. vallismortis* B-14891 im DASbox®-Reaktorsystem mit einer initialen Glucosekonzentration von 200 g/L Glucose und einem Sauerstoffgehalt von 21 % im Begasungsstrom. Die Kultivierungen unterschieden sich in der angewandten Rührerdrehzahl. Abbildung 4.48 zeigt die Kultivierung bei 600 rpm und Abbildung 4.49 bei 700 rpm.

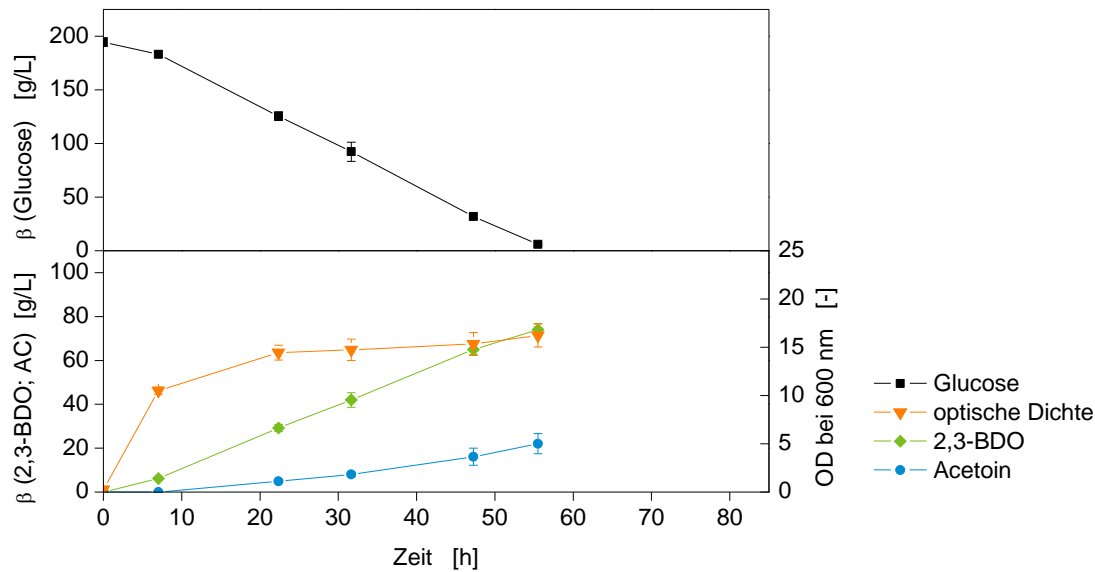


Abbildung 4.48: Kultivierung von *B. vallismortis* B-14891 im 250 mL DASbox® Reaktorsystem mit Basal-HE-Medium mit 200 g/L Glucose, einem Füllvolumen von 100 mL, einer Begasung von 25 sL/h, bei 37 °C und 600 rpm. Freie Säuerung von pH 6,6 ± 0,1 auf pH 5,0 und anschließender pH-Regelung mit 2 M NaOH auf ≥ pH 5. Mittelwerte und Standardabweichungen resultieren aus 3 Kultivierungen.

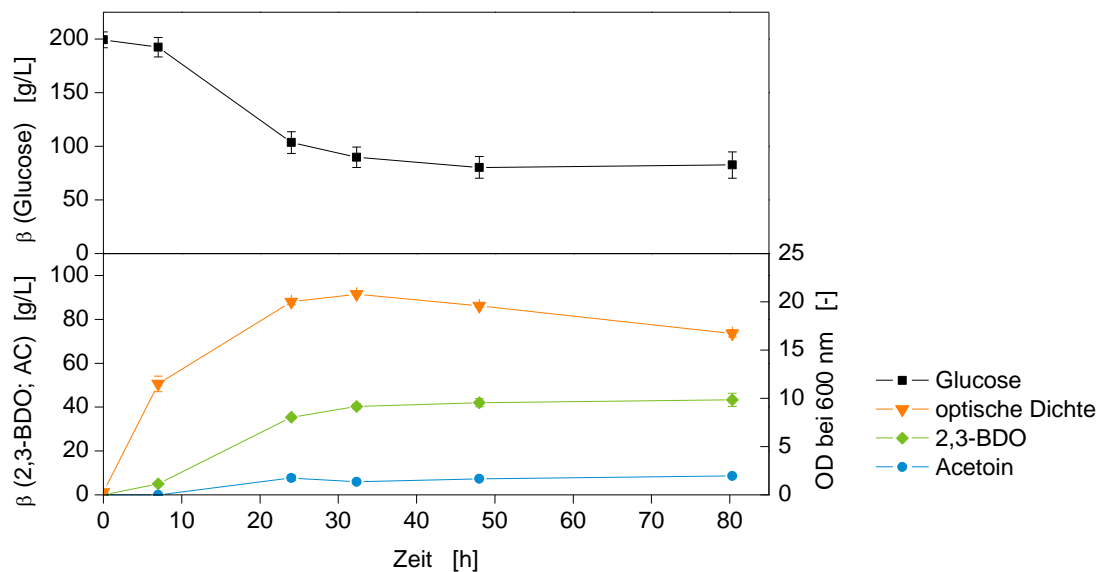


Abbildung 4.49: Kultivierung von *B. vallismortis* B-14891 im 250 mL DASbox® Reaktorsystem mit Basal-HE-Medium mit 200 g/L Glucose, einem Füllvolumen von 100 mL, einer Begasung von 25 sL/h, bei 37 °C und 700 rpm. Freie Säuerung von pH 6,6 ± 0,1 auf pH 5,0 und anschließender pH-Regelung mit 2 M NaOH auf ≥ pH 5. Mittelwerte und Standardabweichungen resultieren aus 2 Kultivierungen.

In beiden Kultivierungen startete das Wachstum direkt nach der Inokulation und erreichte nach 7 h eine optische Dichte bei 600 nm von etwa 10. Im Verlauf der weiteren Kultivierung wurde mit 600 rpm eine maximale optische Dichte von etwa 15,4 erreicht. Die maximale optische Dichte mit 700 rpm erreichte einen Wert von 20,7. Nach 30 h kam die Kultivierung mit einer Rührerfrequenz von 700 rpm zum Erliegen und in der Fermentationsbrühe

verblieben etwa 90 g/L Glucose, die nicht weiter umgesetzt wurden. Nach 80 h wurde eine 2,3-BDO-Konzentration von 43,3 g/L und 8,6 g/L Acetoin gebildet. Bei einer Rührerfrequenz von 600 rpm wurde die gesamte Menge an Glucose verstoffwechselt und 74,1 g/L 2,3-BDO und 22,1 g/L Acetoin gebildet. Die 2,3-BDO Ausbeute lag bei 0,39 g/g mit einer Produktivität von 1,33 g/(L·h).

Bei einer initialen Glucosekonzentration von 100 g/L waren die Bedingungen 700 rpm mit 21 % oder 25 % Sauerstoff im Begasungsstrom gut geeignet und führten zu guten Ausbeuten und den höchsten Produktivitäten (vergl. Kapitel 4.3.4). Bei einer initialen Glucosekonzentration von 200 g/L zeigt sich hingegen, dass die Kultivierungsbedingungen mit 700 rpm und 21 % O₂ nicht geeignet sind.

In Maddox et al. 1996 wird beschrieben, dass die volumetrische 2,3-BDO-Produktivität in direktem Zusammenhang mit der gebildeten Biomasse steht. Eine hohe Biomassebildung sollte daher auch zu einer hohen 2,3-BDO-Bildungsrate führen. Die Kultivierungen mit 200 g/L Glucose und 600 bzw. 700 rpm zeigen, dass eine hohe Biomassebildung allein nicht zu hohen 2,3-BDO-Endkonzentrationen und Produktivitäten führen. In einem weiteren Versuch wurde getestet, ob sich mit einer zweistufig geführten Rührerfrequenz eine höhere Biomassebildung und eine höhere Produktivität erreichen lassen. Hierfür wurde *B. vallismortis* B-14891 für 6,5 h bei einer Rührerfrequenz von 700 rpm kultiviert und anschließend bei 600 rpm (Abbildung 4.50).

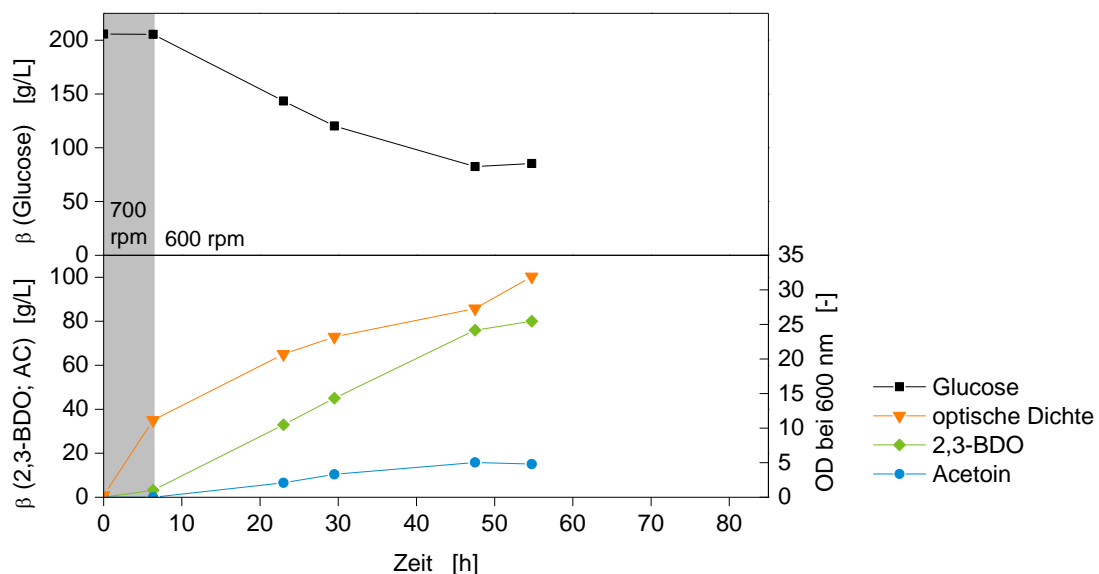


Abbildung 4.50: Kultivierung von *B. vallismortis* B-14891 mit zweistufiger Rührerfrequenz. Kultivierung mit Basal-HE-Medium mit 200 g/L Glucose im 250 mL Reaktor mit einem Füllvolumen von 100 mL, einer Begasungsrate von 25 sL/h mit Luft, einer Rührerfrequenz von 700 rpm für 6,5 h danach 600 rpm bei 37 °C und einem Start-pH-Wert von $6,6 \pm 0,1$ und einer End-pH-Wertregelung bei pH 5,0 mit 2 M NaOH.

In dem Versuch mit einer zweistufigen Rührerfrequenz wurde mehr Biomasse gebildet als im Versuch mit einer durchgängigen Rührerfrequenz von 600 rpm. Nach einer Kultivierungszeit von 47,5 h wurde eine optische Dichte von 27,3 erreicht. Jedoch kam auch diese Kultivierung nach etwa 48 h zum Erliegen und im Kultivierungsmedium verblieben etwa 80 g/L ungenutzte Glucose. Der Versuch verdeutlicht, dass eine hohe Biomassebildung bei *B. vallismortis* B-14891 nicht zwangsläufig zu höheren Produktivitäten führt und die Sauerstoffverfügbarkeit ein kritischer Parameter in der Kultivierung ist. Die Kultivierung bei 600 rpm ist für *B. vallismortis* B-14891 gut geeignet.

4.3.6 Referenzkultivierung

Mit den ermittelten Parametern der Sauerstoffbegasung, Rührerdrehzahl und pH-Endwertregelung für *B. vallismortis* B-14891 wurde eine Referenzkultivierung mit etwa 100 g/L Glucose durchgeführt.

Das Wachstum und der Glucoseumsatz starteten direkt nach dem Beimpfen. Die Glucose wurde mit einer Umsatzrate von 4,5 g/h vom Mikroorganismus aufgenommen. Nach 21,5 h war die Glucose vollständig verwertet. Zu diesem Zeitpunkt war die 2,3-BDO-Konzentration maximal und betrug 32,5 g/L und die Acetoinkonzentration betrug 8,1 g/L. Die Gesamtausbeute lag bei 0,42 g/g und die Gesamtproduktivität bei 1,89 g/(L·h). Nachdem die Glucose verbraucht war, wurde das 2,3-BDO zu Acetoin rückgebildet. Die Umwandlung von 2,3-BDO zu Acetoin dient dabei der Erhaltung des $\text{NAD}^+/\text{NADH}_2^+$ -Gleichgewichtes sowie der Energiegewinnung (siehe Kapitel 2.1.3).

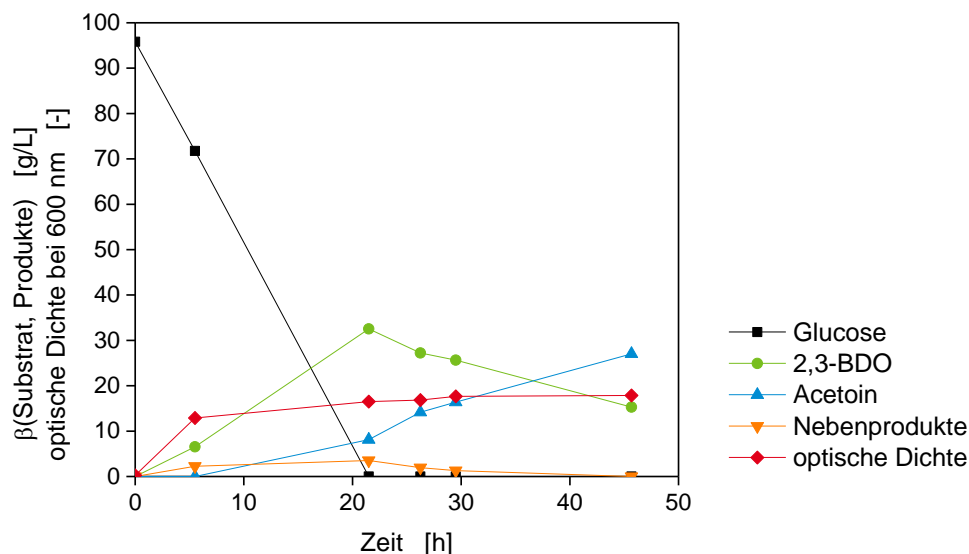


Abbildung 4.51: Referenzkultivierung mit 100 g/L Glucose mit *B. vallismortis* B-14891. Kultivierung im 250 mL Reaktor mit einem Füllvolumen von 100 mL, einer Begasungsrate von 25 sL/h mit Luft, einer Rührerfrequenz von 600 rpm und einem Start-pH-Wert von $6,6 \pm 0,1$ und einer End-pH-Wertregelung bei pH 5,0 mit 2 M NaOH.

Anhand der online Daten lässt sich der Kultivierungsverlauf gut nachvollziehen (Abbildung 4.52). Zum Zeitpunkt 1 erreicht der Gelöstsauerstoff 0 %. Zu diesem Zeitpunkt bildet sich im Verlauf der CTR eine Schulter aus. Die Schulter entsteht durch den Wechsel vom aeroben in den anaeroben Stoffwechselweg. Auch am Verlauf des pH-Wertes ist der Wechsel zu erkennen, hier jedoch zeitversetzt. Der RQ (Respirationsquotient) steigt in den folgenden Stunden auf einen Wert > 1 . Dies spricht für einen anaeroben Stoffwechsel, bei dem mehr CO_2 entsteht als Sauerstoff aufgenommen wird. Nach etwa 7 h erreicht der RQ einen Wert von etwa 1. Dieser Wert wird bei der reinen Verstoffwechselung von Kohlenhydraten erreicht, bei der die gleiche Menge an Sauerstoff aufgenommen wie CO_2 gebildet wird.

Innerhalb von 6 h erreicht die CTR einen Wert von 117 mM/h. Anschließend sinkt die CTR innerhalb der nächsten 2 h auf etwa 58 mM/h (Zeitpunkt 2). Der Abfall wird vermutlich durch den Wechsel von der exponentiellen Wachstumsphase in die stationäre Phase verursacht. Es kann allerdings auch ein Hinweis auf eine Substratlimitierung sein.

Zum markierten Zeitpunkt 3 (nach etwa 20 h) ist die Glucose verbraucht (vergl. **Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.**). Die Limitierung führt zu einem weiteren Abfall der CTR und einem Anstieg im Gelöstsauerstoff. Auch der pH-Wert steigt zu diesem Zeitpunkt wieder an. Dies kann durch die Rückbildung des 2,3-BDOs oder durch eine Zelllyse verursacht werden.

Durch die markanten Punkte im Kurvenverlauf eignet sich die CTR gut zum indirekten Nachweis der Glucoselimitierung sowie der Bestimmung der Sauerstofflimitierung.

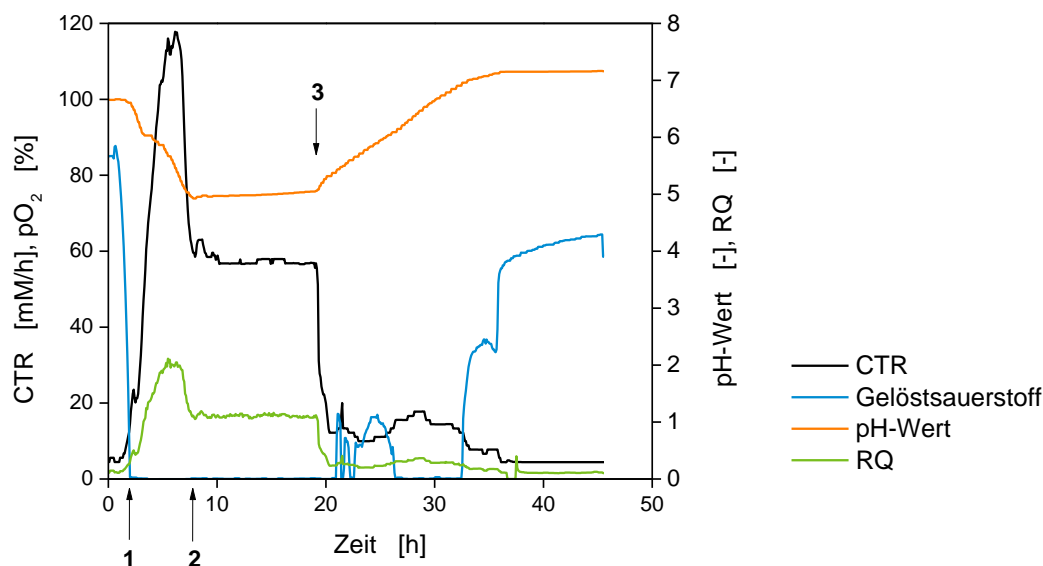


Abbildung 4.52: Online CTR, RQ, Gelöstsauerstoff und pH-Wert der Referenzkultivierung mit 100 g/L Glucose mit *B. vallismortis* B-14891. 1) Sauerstofflimitierung, 2) Wechsel von exponentieller in die stationäre Phase, 3) Glucoselimitierung. Kultivierung im 250 mL Reaktor mit einem Füllvolumen von 100 mL, einer Begasungsrate von 25 sL/h mit Luft, einer Rührerfrequenz von 600 rpm, einer freien Säuerung von $\text{pH } 6,6 \pm 0,1$ und anschließender pH-Endwertregelung bei pH 5,0 mit 2 M NaOH.

4.3.7 Maximale initiale Glucosekonzentration

Im MTP-System konnte *B. vallismortis* B-14891 Glucosekonzentrationen bis 200 g/L zu 2,3-BDO und Acetoin umsetzen (Kapitel 4.2.4). Im DASbox®-Reaktorsystem wurde nochmals eine Versuchsreihe mit Glucosekonzentrationen ≥ 200 g/L durchgeführt. In dem Versuch sollte die maximale initiale Glucosekonzentration bei geregelten Kultivierungsparametern bestimmt werden. Zudem wurden die Versuche genutzt, um das Scale-up vom MTP-System in den Bioreaktor zu bewerten.

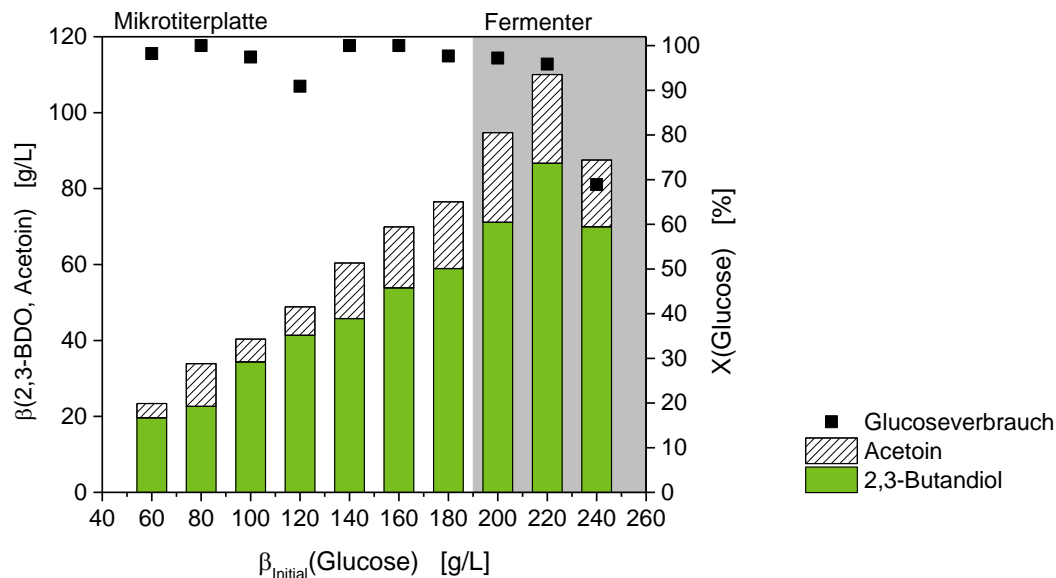


Abbildung 4.53: 2,3-BDO- und Acetoinkonzentration sowie der Substratumsatz (X) in Abhängigkeit der initialen Glucosekonzentration (β_{Initial}) für den Stamm *B. vallismortis* B-14891. Kultivierungen bis 180 g/L Glucose erfolgten in einer 96-Well MTP bei 39 °C und 700 rpm. Kultivierungen ab 200 g/L Glucose wurden im 250 mL DASbox-Reaktorsystem durchgeführt. Das Füllvolumen betrug 100 mL, die Rührerdrehzahl 600 rpm, die Temperatur 37 °C und die Begasung betrug 25 sL/h mit Luft. Es fand eine freie Säuerung von pH $6,6 \pm 0,1$ auf pH 5,0 mit anschließender pH-Regelung mit 2 M NaOH auf pH 5,0 statt.

Im Bioreaktor konnten initiale Glucosekonzentrationen über 200 g/L vollständig von *B. vallismortis* B-14891 verwertet werden. Der Stamm war in der Lage, Konzentrationen bis 220 g/L Glucose für die 2,3-BDO- und Acetoinproduktion zu nutzen (Abbildung 4.53). In der Kultivierung mit 220 g/L Glucose wurden nach 80 h 79,2 g/L 2,3-BDO und 22,2 g/L Acetoin und nach 120 h 86,7 g/L 2,3-BDO und 23,4 g/L Acetoin produziert. Von der Glucose verblieben 9 g/L ungenutzt im Medium. Soweit bekannt, sind dies die höchsten 2,3-BDO- und Acetoinkonzentrationen, die bisher mit einem Risikoklasse-1-Mikroorganismus im Batch-Ansatz produziert worden sind. Da die Ausbeute nach 120 h mit 0,53 g/g über dem theoretischen Maximum von 0,5 g/g lag, fand vermutlich eine Verdunstung statt. Es wurde beobachtet, dass die Verdunstung verstärkt auftritt, wenn die Kultivierung zum Erliegen kommt (Daten nicht gezeigt). Die Werte nach 80 h entsprechen daher einem realistischen Wert ohne signifikante Verdunstungseffekte. Die Produktkonzentration ist auch zu diesem Zeitpunkt höher als Konzentrationen aus Literaturangaben.

Ab einer initialen Glucosekonzentration von 240 g/L kam die Kultivierung zum Erliegen, bevor die 240 g/L Glucose verbraucht waren. Die Kultivierung lief über 71 h. Nach etwa 65 h begann die metabolische Aktivität (detektiert über die online CTR) abzunehmen. Zum Ende der Kultivierung waren noch 75,2 g/L Glucose im Medium enthalten.

In Tabelle 4.18 sind die Gesamtproduktivitäten und -ausbeuten der Kultivierungen im Bioreaktor und der Kultivierung mit 100 und 200 g/L Glucose in der 96-Well MTP dargestellt. *B. vallismortis* B-14891 liefert mit 100 g/L Glucose in beiden Systemen dieselben Leistungen. In der 96-Well MTP mit 200 g/L Glucose verlief die Kultivierung etwas langsamer als im Bioreaktor. Nach 55 h waren noch 14,9 g/L Glucose in der MTP enthalten und in der Reaktorkultivierung 5,0 g/L. Die Produktausbeute im Reaktor war mit 0,46 g/g höher als in der MTP mit 0,42 g/g. Dies verdeutlicht, dass das System der 96-Well MTP für Glucosekonzentrationen ≥ 200 g/L nicht mehr geeignet ist. Insgesamt stimmen die Systeme jedoch gut überein. Die Kultivierungsbedingungen für den Reaktor sind gut gewählt und ein Scale-up vom MTP-System in den Bioreaktor ist bis zu Glucosekonzentrationen < 200 g/L möglich.

Tabelle 4.18: Ausbeute und Produktivität bezogen auf die Produktbildung (2,3-BDO + Acetoin) und Glucosekonzentration zum Zeitpunkt der letzten Probenahme bei Kultivierungen mit unterschiedlichen initialen Glucosekonzentrationen mit *B. vallismortis* B-14891. Kultivierung in 96-Well MTP und im DASbox®-Reaktorsystem.

Initiale Glucosekonzentration	T _{End} [h]	Glucose zum Zeitpunkt T _{End} [g/L]	Gesamt- ausbeute [g/g]	Gesamt- produktivität [g/(L·h)]
100 g/L 96-Well MTP	22	2,5	0,42	1,89
200 g/L 96-Well MTP	55	14,9	0,42	1,43
100 g/L Bioreaktor	22	0,0	0,42	1,89
200 g/L Bioreaktor	55	5,0	0,46	1,62
220 g/L Bioreaktor	80	13,1	0,50	1,27
240 g/L Bioreaktor	71	75,2	0,53	1,24

4.3.8 Fed-Batch-Kultivierung

Im Batch-Ansatz mit *B. vallismortis* B-14891 konnte eine 2,3-BDO- und Acetoinendkonzentration von 110,1 g/L mit einer Produktivität von 1,27 g/(L·h) erreicht werden. Um den Endtiter und die Produktivität zu steigern, wurden Versuche im Fed-Batch-Ansatz durchgeführt. Die Kultivierungen erfolgten im DASbox®-System. Die Feeds wurden, soweit nicht anders beschrieben, als Feststoff zugesetzt.

Die höchsten Produktivitäten wurden im Batch-Ansatz mit einer initialen Glucosekonzentration von 100 g/L erreicht (siehe Kapitel 4.2.4). Für hohe Endtiter und hohe Produktivitäten wurde daher ein Fed-Batch-Ansatz durchgeführt, mit einer initialen Glucosekonzentration von 100 g/L. Sobald die Glucose eine Konzentration von etwa 50 g/L erreichte, wurde 50 g/L Glucose nachgefüllt. Im Feed 2 und 4 wurde dem Ansatz zusätzlich

10 g/L Hefeextrakt zugesetzt, um eine Limitierung an Komplexbestandteilen zu verhindern (Abbildung 4.54).

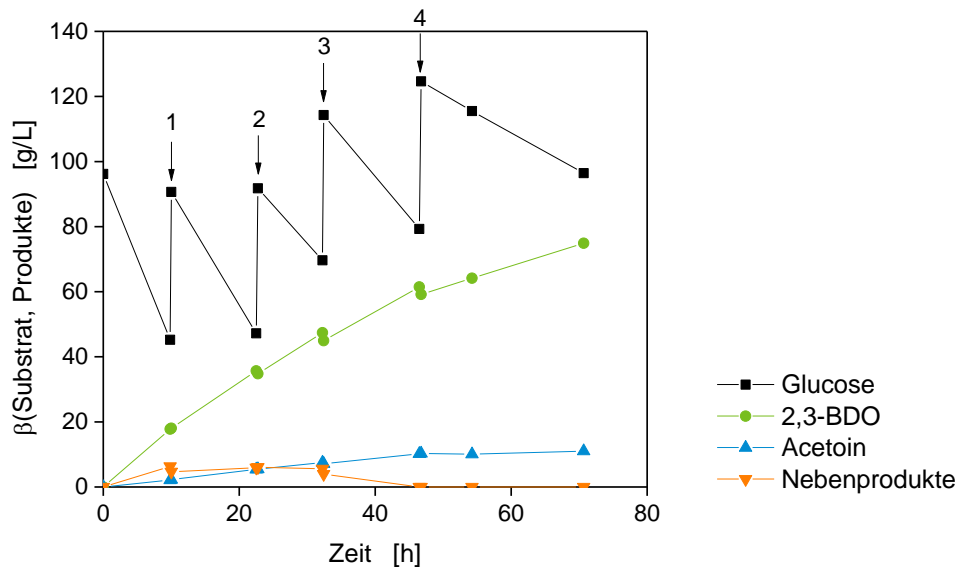


Abbildung 4.54: Fed-Batch-Kultivierung mit *B. vallismortis* B-14891 mit Glucose und Hefeextrakt. Kultivierung im 250 mL Reaktor mit einem Füllvolumen von 100 mL, einer Begasungsrate von 25 sL/h mit Luft und einer Rührerfrequenz von 600 rpm. Es fand eine freie Säuerung von pH $6,6 \pm 0,1$ auf pH 5,0 mit anschließender pH-Regelung mit 2 M NaOH auf pH 5,0 statt. Feed (markiert durch Pfeile) 1 und 3: 50 g/L Glucose und Feed 2 und 4: 50 g/L Glucose + 10 g/L Hefeextrakt.

Insgesamt wurden in dem Fed-Batch-Ansatz 276,1 g/L Glucose eingesetzt, von denen 179,7 g/L verwertet wurden. Innerhalb von 71 h wurden 74,9 g/L 2,3-BDO und 11,0 g/L Acetoin produziert. Die Gesamtproduktivität lag bei 1,1 g/(L·h) und die 2,3-BDO- und Acetoinausbeute bei 0,48 g/g. Verglichen mit der Batch-Kultivierung mit einer initialen Glucosekonzentration von 220 g/L wurde die Glucose mit einer geringeren Gesamtproduktivität zu 2,3-BDO und Acetoin umgesetzt und auch der Endtiter konnte in dem Fed-Batch-Ansatz nicht gesteigert werden.

Anhand von Tabelle 4.19 ist eine sukzessive Abnahme der spezifischen Glucoseumsatzrate und der spezifischen Produktivität in den Phasen zwischen den Feeds zu erkennen. Die Glucoseumsatzrate lag zu Beginn der Kultivierung bei 5,2 g/h und sank bis zum Ende der Kultivierung auf 1,2 g/h. Analog dazu sank die spezifische 2,3-BDO-Produktivität von 1,8 auf 0,7 g/(L·h). Die spezifische 2,3-BDO-Ausbeute hingegen war zu Beginn der Fermentation mit 0,35 g/g am niedrigsten. Im weiteren Kultivierungsverlauf nahm sie einen relativ konstanten hohen Wert zwischen 0,41 und 0,57 g/g ein.

Tabelle 4.19: Spezifischer Glucoseumsatz, 2,3-BDO-Produktivität und -Ausbeute der Fed-Batch-Kultivierung mit *B. vallismortis* B-14891 mit vier Feeds mit je 50 g/L Glucose (Glu) und Feed 2 und 4 mit zusätzlich 10 g/L Hefeextrakt (HE).

Feed	Kultivierungszeit [h]	Spezifischer Glucoseumsatz [g/h]	Spezifische 2,3-BDO-Produktivität [g/(L·h)]	Spezifische 2,3-BDO-Ausbeute [g/g]
0	0 – 10	5,2	1,8	0,35
1 (Glu)	10 – 23	3,5	1,4	0,41
2 (Glu + HE)	23 – 32	2,3	1,3	0,57
3 (Glu)	32 – 47	2,5	1,2	0,47
4 (Glu + HE)	47 – 71	1,2	0,7	0,56

Anhand der CTR in Abbildung 4.55 ist zu erkennen, dass unmittelbar nach der Zugabe der Feeds 1, 2 und 4 die metabolische Aktivität abnahm. Mit Zugabe des 4. Feeds kam die Kultivierung zum Erliegen. Der dritte Feed führte zu keiner signifikanten Abnahme der CTR. Der Feed wurde gleich zu den anderen Feeds durchgeführt. Warum dieser Feed zu keiner Abnahme der CTR führte, ist nicht bekannt. Entscheidend für einen erfolgreichen Fed-Batch ist jedoch, dass durch den Feed die metabolische Aktivität nicht abnimmt.

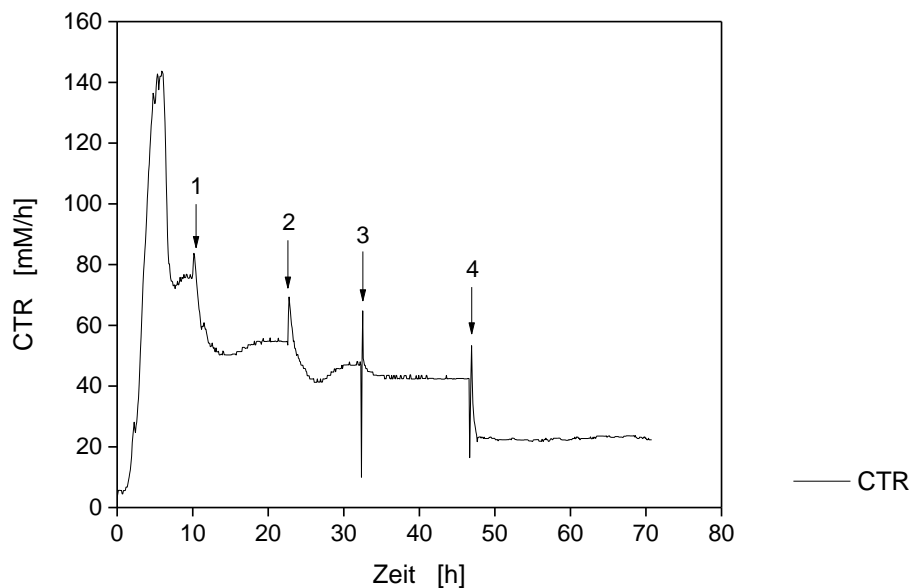


Abbildung 4.55: Online CTR im Fed-Batch-Ansatz mit *B. vallismortis* B-14891 mit Glucose und Hefeextrakt. Feed im Wechsel: 50 g/L Glucose und 50 g/L Glucose + 10 g/L Hefeextrakt.

Da das Zufügen des Substrates den Organismus zu hemmen scheint, wurde ein weiterer Fed-Batch-Ansatz mit weniger Feeds, dafür mit einem höheren Glucosegehalt, durchgeführt (Abbildung 4.56).

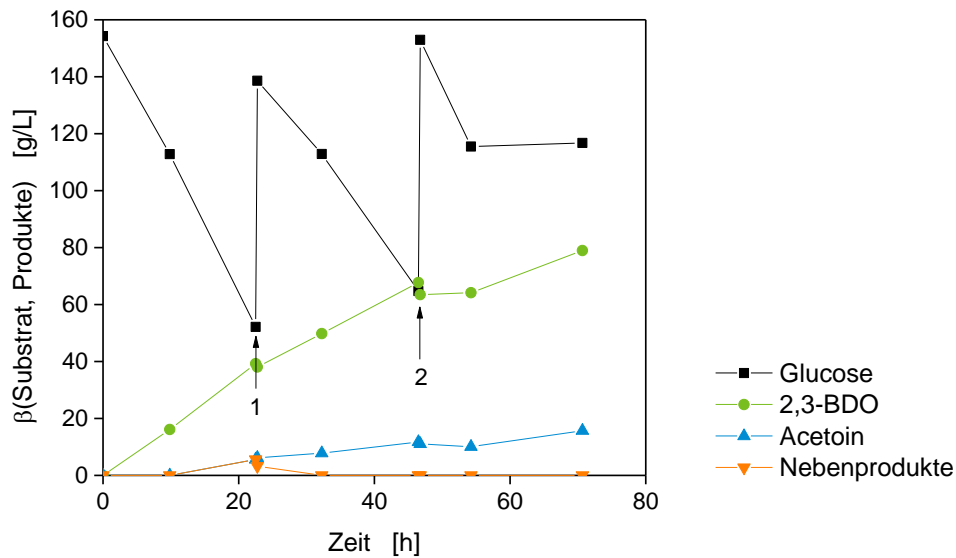


Abbildung 4.56: Fed-Batch-Kultivierung mit *B. vallismortis* B-14891 mit Glucose. Kultivierung im 250 mL Reaktor mit einem Füllvolumen von 100 mL, einer Begasungsrate von 25 sL/h mit Luft und einer Rührerfrequenz von 600 rpm. Es fand eine freie Säuerung von $\text{pH } 6,6 \pm 0,1$ auf $\text{pH } 5,0$ mit anschließender pH-Regelung mit 2 M NaOH auf $\text{pH } 5,0$ statt. Feed 1 + 2 (markiert durch Pfeile): 100 g/L Glucose + 10 g/L Hefeextrakt.

Der zweite Fed-Batch-Ansatz wurde mit einer initialen Glucosekonzentration von 154 g/L gestartet. Es wurden jeweils 100 g/L Glucose pro Feed nachgefüllt, sobald die Glucosekonzentration einen Wert von etwa 60 g/L erreichte. Mit jedem Feed wurden zusätzlich 10 g/L Hefeextrakt zugegeben, um eine Limitierung der Komplexbestandteile zu vermeiden.

In der Fed-Batch-Kultivierung wurden insgesamt 329,0 g/L Glucose eingesetzt, von denen 212,2 g/L verbraucht wurden. Dabei bildete *B. vallismortis* B-14891 79,0 g/L 2,3-BDO und 15,7 g/L Acetoin. Dies ergibt eine Gesamtausbeute von 0,45 g/g und eine Produktivität von 1,34 g/(L·h). Verglichen mit der Batch-Kultivierung mit 220 g/L Glucose, wurde weniger Produkt gebildet, wobei in etwa dieselbe Menge an Glucose verwertet wurde.

Anhand der CTR ist auch in diesem Versuch zu erkennen, dass mit jedem Feed die metabolische Aktivität abnimmt (Abbildung 4.57). Wenn nicht der Feed selbst Ursache für die CTR-Abnahme ist, führt möglicherweise eine Anreicherung von Komplexbestandteilen zur Abnahme der metabolischen Aktivität. Diese Theorie wurde in einem dritten Fed-Batch-Ansatz untersucht.

Ergebnisse und Diskussion

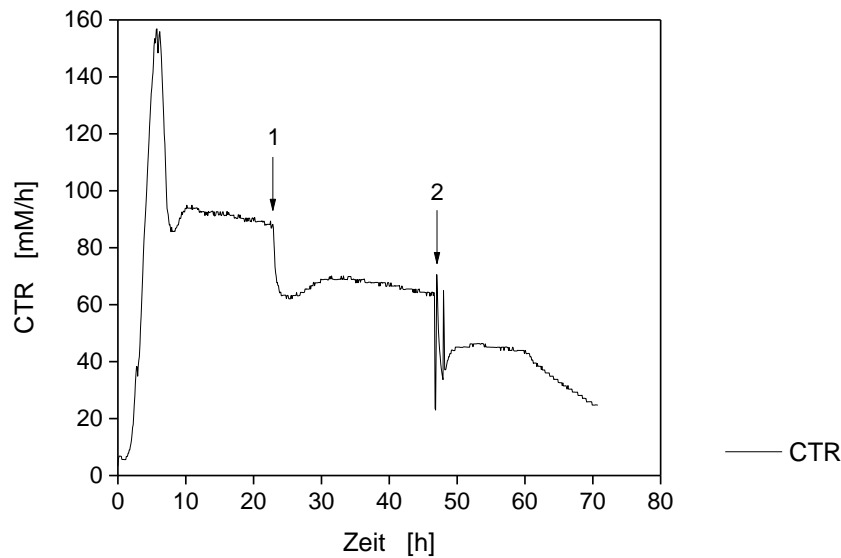


Abbildung 4.57: Online CTR im Fed-Batch-Ansatz mit *B. vallismortis* B-14891 mit Glucose. Feed 1 + 2 (markiert durch Pfeile): 100 g/L Glucose + 10 g/L Hefeextrakt.

In Kapitel 4.2.3 konnte gezeigt werden, dass *B. vallismortis* B-14891 keine Komplexbestandteile für das Wachstum oder die Produktion von 2,3-BDO benötigt. Die Menge an Hefeextrakt wurde daher von 10 auf 1 g/L Hefeextrakt pro Feed reduziert (Abbildung 4.58).

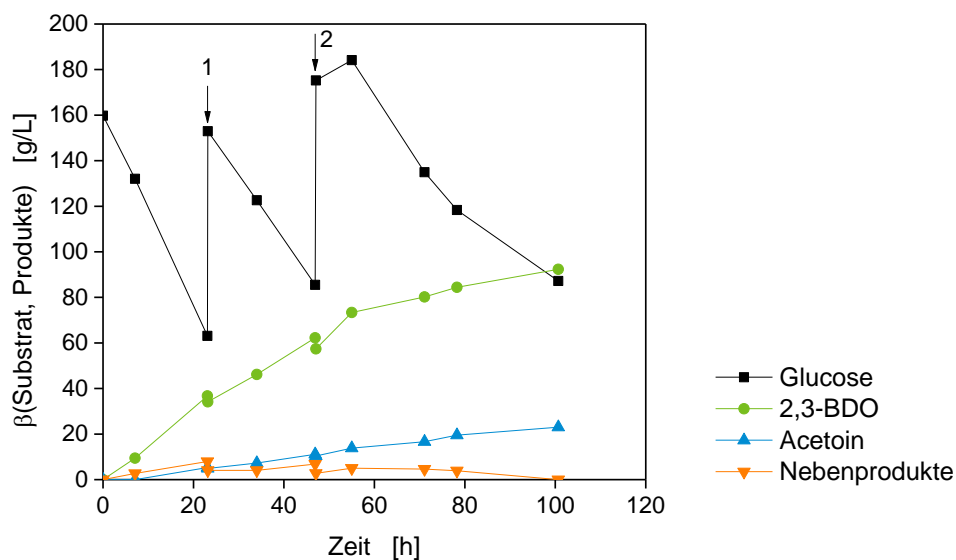


Abbildung 4.58: Fed-Batch-Kultivierung mit *B. vallismortis* B-14891 mit Glucose. Kultivierung im 250 mL Reaktor mit einem Füllvolumen von 100 mL, einer Begasungsrate von 25 sL/h mit Luft und einer Rührerfrequenz von 600 rpm. Es fand eine freie Säuerung von $\text{pH } 6,6 \pm 0,1$ auf $\text{pH } 5,0$ mit anschließender pH-Regelung mit 2 M NaOH auf $\text{pH } 5,0$ statt. Feed 1 + 2 (markiert durch Pfeile): 100 g/L Glucose + 1 g/L Hefeextrakt.

Im dritten Fed-Batch-Ansatz wurden insgesamt 339,4 g/L Glucose eingesetzt, von denen 252,1 g/L verbraucht wurden. Dabei wurden 92,3 g/L 2,3-BDO und 23,0 g/L Acetoin gebildet. Die Gesamtproduktivität lag bei 1,1 g/(L·h) und die -ausbeute bei 0,46 g/g. Der Endtiter

konnte in dieser Kultivierung geringfügig, gegenüber dem Batch-Ansatz mit 220 g/L Glucose, gesteigert werden. Die Ausbeute und Produktivität fielen etwas geringer aus.

Aus dem dritten Fed-Batch-Ansatz wird deutlich, dass die Hefeextraktzugabe von 10 auf 1 g/L Hefeextrakt pro Feed reduziert werden kann. Die Reduzierung wirkte sich sogar positiv auf den Endtiter aus. Die CTR sank dennoch mit jedem Feed (Abbildung 4.59). Damit kann ausgeschlossen werden, dass eine Anreicherung von Komplexbestandteilen die Ursache für den metabolischen Aktivitätsverlust ist. Da der Aktivitätsverlust mit jedem Feed eintritt und scheinbar unabhängig von der zugefütterten Glucosemenge ist, scheint ein Fed-Batch-Ansatz mit möglichst wenigen Feeds erstrebenswert.

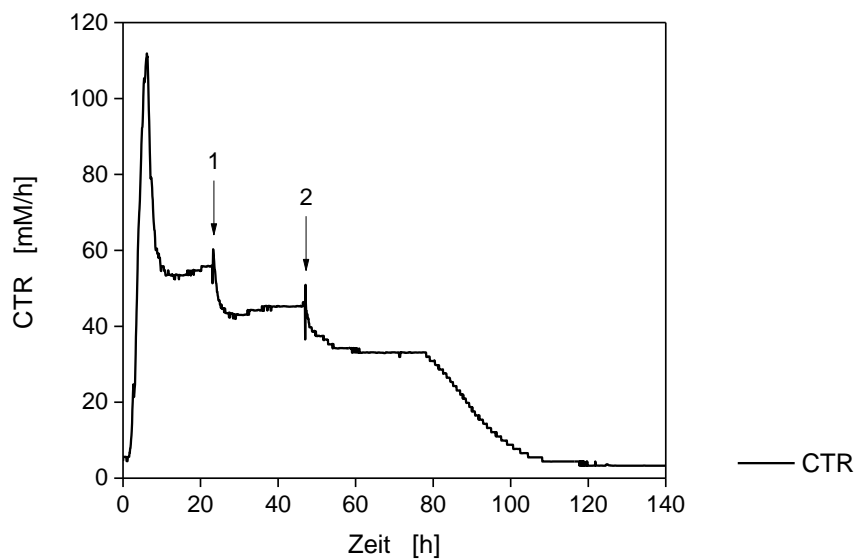


Abbildung 4.59: Online CTR im Fed-Batch-Ansatz mit *B. vallismortis* B-14891 mit Glucose. Feed 1 + 2 (markiert durch Pfeile): 100 g/L Glucose + 1 g/L Hefeextrakt.

Petrov und Petrova (2010) erzielten höhere 2,3-BDO-Konzentrationen durch gezielte pH-Shifts während der Kultivierung. Es wurde zusätzlich eine Fed-Batch-Kultivierung durchgeführt, in dem dieser Ansatz verfolgt wurde. Insgesamt wurden zwei Kultivierungen durchgeführt, bei denen die Anzahl der Feeds auf einen Feed reduziert wurde. Im ersten Ansatz fand eine freie Säuerung von pH 6,6 auf 5,0 statt und anschließend wurde der pH auf $\geq 5,0$ mit 4 M NaOH gehalten. Dieser Ansatz dient als Referenz. In einem zweiten Fed-Batch-Ansatz fand eine freie Säuerung von einem Start-pH-Wert von 6,6 statt. Mit dem Feed wurde der pH-Wert wieder auf 6,5 erhöht. Anschließend konnte der Stamm frei bis auf einen pH-Wert von 5,0 ansäuern. Anders als bei Petrov und Petrova 2010, wurde in diesem Versuch nur ein pH-Shift durchgeführt.

Die Referenzkultivierung und der Fed-Batch-Ansatz mit pH-Shift weisen den gleichen Kultivierungsverlauf auf (Abbildung 4.60). Innerhalb von 29,5 h wurden etwa 120 g/L Glucose von den anfänglich eingesetzten 160 g/L verbraucht. Die Glucoseumsatzrate lag bei 3,9 g/h bzw. bei 3,7 g/h in dem pH-Shift-Ansatz. Zu diesem Zeitpunkt wurde der Feed durchgeführt und die Glucosekonzentration wieder auf etwa 160 g/L gebracht. Im pH-Shift-Ansatz wurde während des Feeds der pH-Wert von 5,2 auf 6,5 mit 4 M NaOH gehoben (Abbildung 4.61).

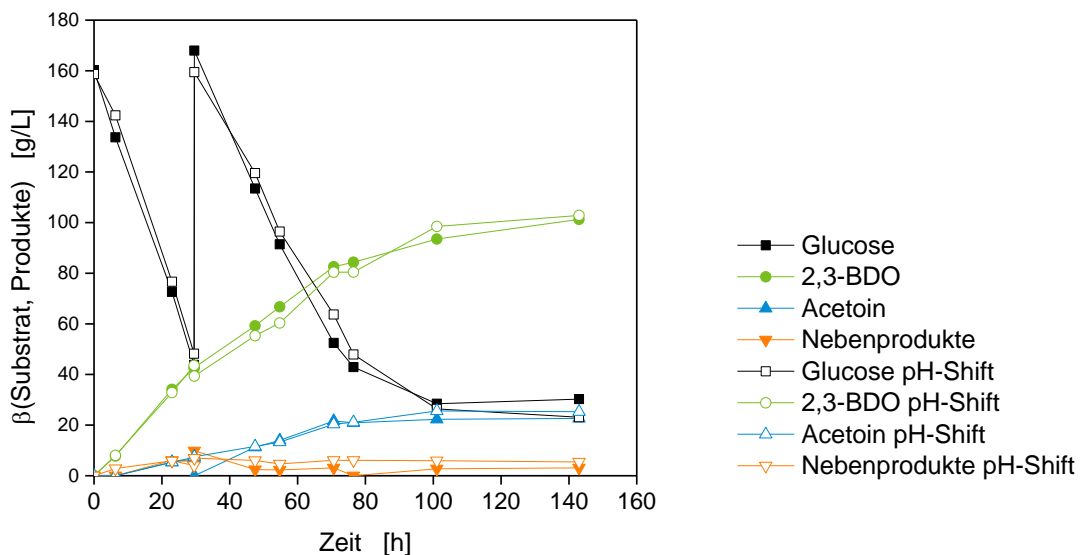


Abbildung 4.60: Fed-Batch-Kultivierung mit *B. vallismortis* B-14891 mit Glucose. Kultivierung im 250 mL Reaktor mit einem Füllvolumen von 100 mL, einer Begasungsrate von 25 sL/h mit Luft, einer Rührerfrequenz von 600 rpm und einer freien Säuerung von pH 6,6 ± 0,1 auf pH 5 und einer anschließenden pH-Regelung auf pH 5,0 in der Referenzkultivierung (volle Symbole). In der Vergleichskultivierung wurde der pH-Wert bei Zugabe des Feeds auf pH 6,5 erhöht, anschließend fand eine pH-Regelung ab pH 5,0 statt (leere Symbole). Feed: 100 g/L Glucose + 1 g/L Hefeextrakt.

Nach dem pH-Shift sank der pH-Wert innerhalb von 2,5 h auf einen pH-Wert von 5,4. Im weiteren Verlauf wurde das Medium nicht weiter durch den Stamm angesäuert. In der Referenzkultivierung sank der pH-Wert innerhalb von 8 h auf einen pH-Wert von 5,1. Anschließend stieg der pH-Wert bis zu einem Maximalwert von 5,6. Bis zum Ende der Kultivierung pendelte sich der pH-Wert auf einen Wert von 5,4 ein. In diesem Ansatz sank der pH-Wert zu keinem Zeitpunkt auf einen pH-Wert ≤ 5,0. Folglich setzte keine pH-Regelung ein.

Zum Ende der Kultivierung wiesen die Ansätze im pH-Verlauf Unterschiede auf. Im Referenzansatz pendelte sich der pH-Wert von 5,6 auf 5,4 ein. Im Ansatz mit pH-Shift stieg der pH-Wert kontinuierlich bis zum Ende der Fermentation bis auf einen Wert von 6,2. Es wurde kein Nebenprodukt detektiert, welches diesen pH-Anstieg erklärt. Es ist möglich, dass eine Zelllyse zum pH-Anstieg führte.

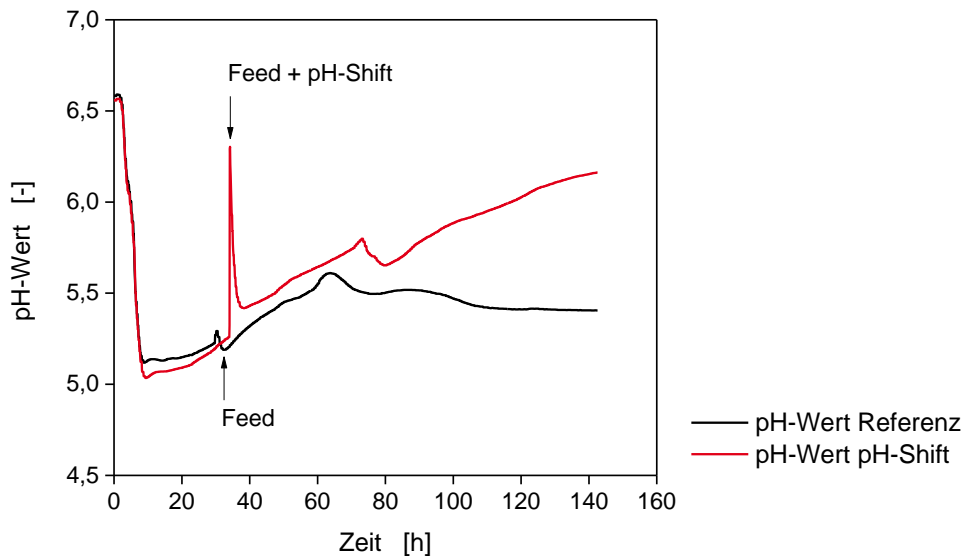


Abbildung 4.61: pH-Verlauf der Referenz-Fed-Batch-Kultivierung (schwarz) und der Fed-Batch-Kultivierung mit pH-Shift zum Feed (rot). Kultivierung im 250 mL Reaktor mit einem Füllvolumen von 100 mL, einer Begasungsrate von 25 sL/h mit Luft, einer Rührerfrequenz von 600 rpm einer freien Säuerung von $\text{pH } 6,6 \pm 0,1$ auf $\text{pH } 5,0$ und einer anschließenden pH-Regelung auf $\text{pH } 5,0$ in der Referenzkultivierung (volle Symbole). In der Vergleichskultivierung wurde der pH-Wert bei Zugabe des Feed auf $\text{pH } 6,5$ erhöht, anschließend fand eine pH-Regelung ab $\text{pH } 5,0$ statt Feed: 100 g/L Glucose + 1 g/L Hefeextrakt.

Nach dem Feed wurde in beiden Ansätzen die Glucose mit Raten von 2,7 und 2,4 g/h umgesetzt (Abbildung 4.60). Nach 77 h sank die Umsatzrate und beide Kultivierungen kamen zum Erliegen bevor die Glucose vollständig verbraucht war. Im Referenz Fed-Batch wurden 101,3 g/L 2,3-BDO und 22,7 g/L Acetoin produziert. Es wurde eine Gesamtproduktivität von 0,87 g/(L·h) und eine Gesamtausbeute von 0,49 g/g erreicht. Im Fed-Batch mit pH-Shift lag der Endtiter bei 102,7 g/L 2,3-BDO und 25,3 g/L Acetoin. Die Gesamtproduktivität lag bei 0,90 g/(L·h) und die Ausbeute bei 0,52 g/g. Die Ausbeute über dem theoretischen Maximum von 0,5 g/g weist auf Verdunstungseffekte während der Kultivierung hin.

Durch den pH-Shift zum Feed konnte keine signifikante Steigerung der Ausbeute oder Produktivität erzielt werden. Auch die Reduzierung von mehreren Feeds auf einen Feed führte zu keiner Steigerung der 2,3-BDO-Produktion.

Alle Fed-Batch-Ansätze mit reduziertem Hefeextrakt erzielten höhere Endtiter als Kultivierungen mit 10 g/L Hefeextrakt im Feed. Der Titer stieg um etwa 20 g/L. Die Fed-Batch-Ansätze mit reduziertem Hefeextrakt im Feed lieferten alle in etwa denselben Endtiter sowie dieselben Ausbeuten und Produktivitäten. Eine Substratlimitierung oder eine Produkthemmung könnten Ursache dafür sein, dass sich der Endtiter nicht steigern ließ. Um eine Limitierung auszuschließen, wurde ein weiterer Fed-Batch-Ansatz durchgeführt, in dem zusätzlich zur Glucose die Bestandteile der Lösung 2, 3, 4 und 6 zugefüttert wurden. Der Feed erfolgte wie zuvor mit trockenen Substanzen, bis auf Lösung 6, die als Flüssigkeit

zugefügt wurde. Mit dem Feed wurde 1 g/L Hefeextrakt und alle anderen Bestandteile mit der ursprünglichen Startmenge zugegeben (Abbildung 4.62).

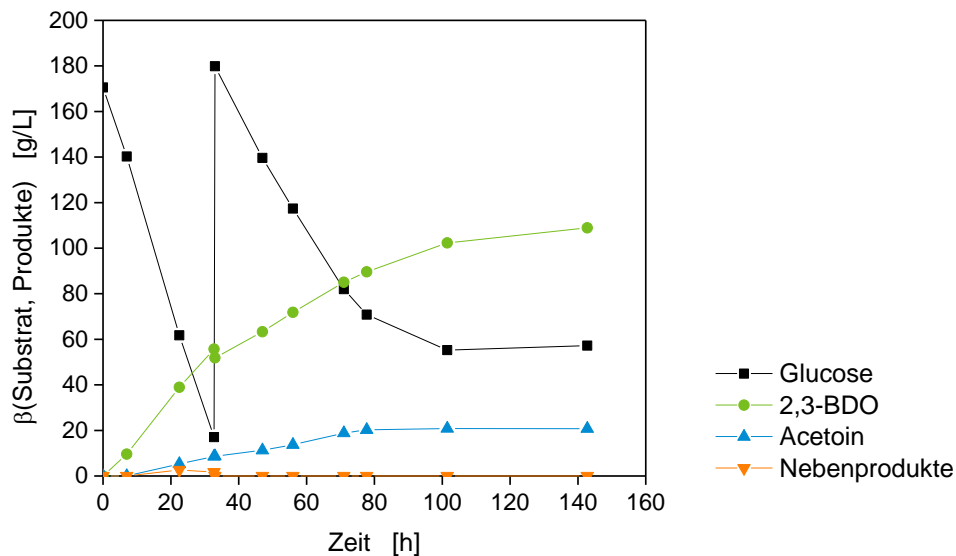


Abbildung 4.62: Fed-Batch-Kultivierung mit *B. vallismortis* B-14891 mit Glucose. Kultivierung im 250 mL Reaktor mit einem Füllvolumen von 100 mL, einer Begasungsrate von 25 sL/h mit Luft, einer Rührerfrequenz von 600 rpm und einer freien Säuerung von pH 6,6 ± 0,1 auf pH 5,0 und einer anschließenden pH-Regelung auf pH 5,0 mit 2 M NaOH. Feed: 160 g/L Glucose, 1 g/L Hefeextrakt sowie Medienbestandteile der Lösung 2, 3, 4 und 6.

Der Fed-Batch Ansatz startete mit einer Glucoseumsatzrate von 4,7 g/h innerhalb der ersten 33 h. Zu diesem Zeitpunkt erfolgte der Feed. Im weiteren Verlauf wurde die Glucose mit einer Rate von 2,4 g/h bis zur 78 h umgesetzt. Danach reduzierte sich die Glucoseumsatzrate, bis schließlich keine weitere Glucose mehr verwertet wurde. Im Medium verblieben etwa 56 g/L Glucose.

In dem Fed-Batch-Ansatz wurde ein 2,3-BDO-Endtiter von 108,9 g/L und 20,8 g/L Acetoin erreicht. Die Gesamtausbeute lag bei 0,47 g/g und die Gesamtproduktivität bei 0,91 g/(L·h). Der Endtiter konnte in diesem Ansatz gesteigert werden. Allerdings lief die Kultivierung nicht bis zur Glucoselimitierung. Insgesamt konnte der Endtiter in den Fed-Batch-Kultivierungen verglichen mit der Batch-Kultivierung mit 220 g/L Glucose nicht wesentlich gesteigert werden. Eine Produkthemmung scheint daher wahrscheinlich zu sein.

4.4 Medien- und Prozessoptimierung für *B. vallismortis* B-14891 mit Xylose als Kohlenstoffquelle

4.4.1 Einfluss einer pH-Endwertregelung im Bioreaktor

Nach Garg und Jain 1995 ist der optimale pH-Endwert für die 2,3-BDO-Produktion abhängig vom verwendeten Substrat. Der Einfluss der pH-Endwertregelung bei der freien Säuerung wurde daher nochmals für das Substrat Xylose untersucht.

Mit dem Substrat Xylose wurde der pH-Endwert von 4,6 – 6,2 in aufsteigenden Einheiten von 0,2 variiert. Der Start-pH-Wert lag bei allen Kultivierungen bei $6,6 \pm 0,1$. Die Probenahme zur Bestimmung der Produkte und Nebenprodukte erfolgte nach 48 h bzw. nach 30 h und 30,5 h für die Proben der pH-Endwertregelung 6,0 und 6,2. In allen Kultivierungen fand nach 48 h keine metabolische Aktivität mehr statt. Dies wurde mittels Abgasanalytik bestimmt.

In Abbildung 4.63 ist die Xyloseverwertung und Produktbildung in Abhängigkeit der pH-Endwertregelung über die Zeit dargestellt.

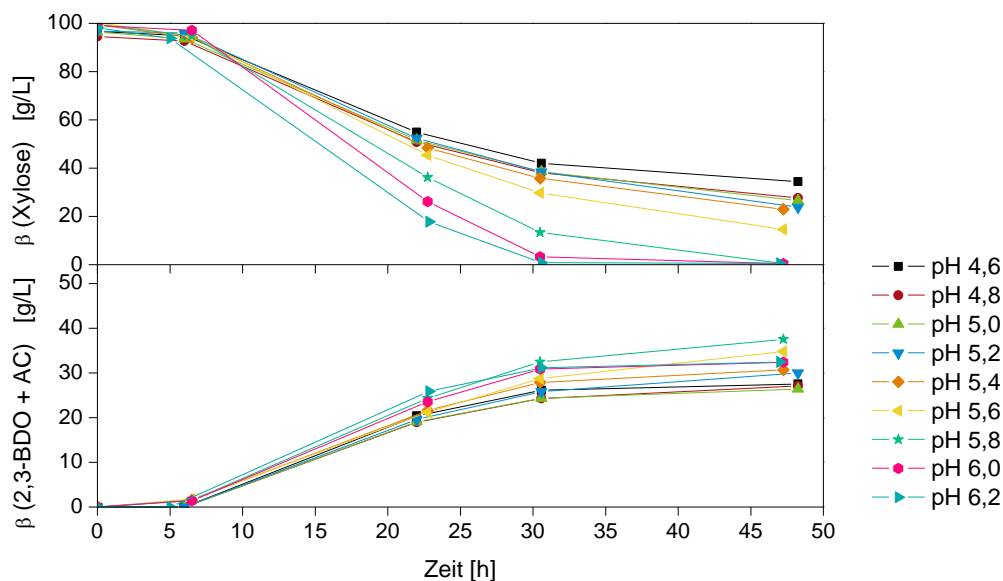


Abbildung 4.63: Xyloseverwertung, 2,3-Butandiol- und Acetoinbildung in Abhängigkeit der pH-Endwertregelung mit *B. vallismortis* B-14891. Kultivierung im 250 mL Reaktor mit einem Füllvolumen von 100 mL, einer Begasungsrate von 25 sL/h mit Luft, einer Rührerfrequenz von 400 rpm und einem Start-pH-Wert von $6,6 \pm 0,1$.

Mit sinkendem pH-Endwert sinkt der Xyloseumsatz. *B. vallismortis* B-14891 wird demnach bei Einsatz von Xylose als Substrat durch einen niedrigen pH-Wert inhibiert. Bei einer pH-Endwertregelung von 4,6 wurden nur etwa 65 % des Substrates verwertet. Ab einem pH-Wert von 5,8 ist der Stamm in der Lage, die gesamte Xylose zu nutzen. Mit steigendem pH-Endwert wird mehr Xylose verwertet. Ab einem pH-Endwert von 5,8 werden die eingesetzten 100 g/L Xylose vollständig umgesetzt. Bis zu einem pH-Wert von 5,8 nimmt zudem die 2,3-BDO- und Acetoinbildung sukzessive zu. Mit pH-Werten über 5,8 steigt die

Xyloseumsatzgeschwindigkeit, die Produktbildung hingegen nimmt wieder ab. Mit pH-Endwerten von 4,6 bis 5,0 wurden jeweils Endkonzentrationen von etwa 22 g/L 2,3-BDO und Acetoin gebildet. Bei einem End-pH-Wert von 5,8 wurden maximale Konzentrationen von 41,0 g/L 2,3-BDO und Acetoin mit einer Produktausbeute von 0,41 g/g erreicht.

In Abbildung 4.64 ist zusätzlich das Nebenproduktspektrum der 2,3-BDO-Produktion von *B. vallismortis* B-14891 mit Xylose in Abhängigkeit des End-pH-Wertes dargestellt. Das Nebenproduktspektrum mit Xylose weist Unterschiede zum Nebenproduktspektrum mit Glucose auf (vergl. Abbildung 4.44). Im pH-Bereich von 4,6 bis 5,6 ist Acetat das einzige Nebenprodukt. In den sechs Ansätzen wurde relativ konstant 4,0 – 4,4 g/L Acetat gebildet. Anschließend stieg mit zunehmendem pH-Endwert die Acetatkonzentration auf maximal 8,0 g/L bei einem pH-Endwert von 5,8. Bei pH-Endwerten über pH 5,8 sank die Acetatkonzentration schließlich wieder.

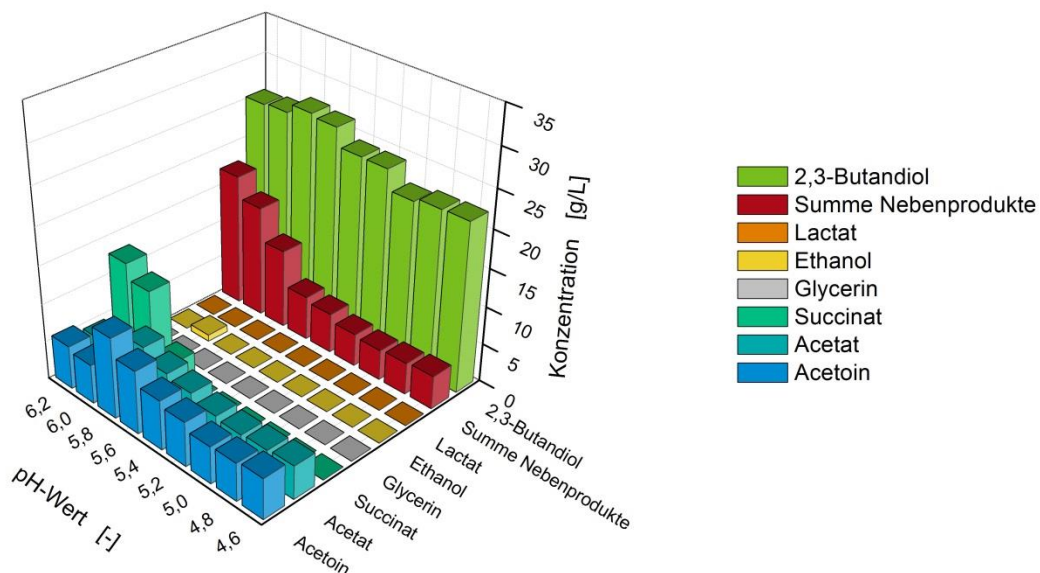


Abbildung 4.64: Nebenproduktspektrum von *B. vallismortis* B-14891 in Abhängigkeit der pH-Endwertregelung bei der Kultivierung mit Xylose. Kultivierung im 250 mL Reaktor mit einem Füllvolumen von 100 mL, einer Begasungsrate von 25 sL/h mit Luft, einer Rührerfrequenz von 400 rpm und einem Start-pH-Wert von $6,6 \pm 0,1$. Die Probenahme erfolgte jeweils nach Eintritt der Xyloselimitierung bzw. nach 48 h. Die Summe der Nebenprodukte fasst die Bildung von Acetat, Succinat, Glycerin, Ethanol und Lactat zusammen.

Succinat wurde ab einer pH-Endwertregelung von 5,8 gebildet und stieg von 3,4 g/L auf 14,3 g/L bei pH 6,2. Bei den pH-Werten 6,0 und 6,2 war Succinat das Hauptnebenprodukt. Die Nebenprodukte Glycerin und Lactat konnten in keiner Kultivierung nachgewiesen werden und Ethanol nur zu geringen Mengen bei einer pH-Endwertregelung von 6,0. Die Bildung von Acetoin stieg graduell von 5,3 g/L bei einer pH-Endwertregelung von 4,4 auf 11,6 g/L bei pH 5,8 und sank anschließend wieder auf 6,3 g/L. Bei pH 5,8 wurde eine maximale 2,3-BDO-Konzentration von 29,4 g/L gebildet. Bei einer pH-Endwertregelung von 5,8 wurde insgesamt der meiste Kohlenstoff in den 2,3-BDO-Stoffwechselweg geschleust.

Der pH 5,8 scheint für die Kultivierung von *B. vallismortis* B-14891 mit Xylose als einzige Kohlenstoffquelle geeignet zu sein. Insgesamt wurden mit Xylose geringere Produktkonzentrationen erreicht als mit Glucose und die optimale pH-Endwertregelung mit Xylose liegt höher als mit Glucose.

Die Gesamtnebenproduktkonzentration steigt mit zunehmender pH-Endwertregelung von 4,6 auf 6,0 um den Faktor 3,4. Der relative Anstieg der Nebenprodukte ist damit höher, als bei den Kultivierungen mit Glucose. Die Gesamtkonzentration der Nebenprodukte ist in allen Kultivierungen mit Xylose geringer als in Kultivierungen mit Glucose. Der Faktor für die 2,3-BDO-Bildung sinkt mit sinkendem pH-Wert, um den Faktor 1,3. Die in der Literatur angegebenen Faktoren für die Abnahme an organischen Säuren bzw. die Zunahme an 2,3-BDO beim Wechsel von pH > 6,3 zu pH < 6,3 (Mickelson und Werkman 1938) weichen von den ermittelten Werten für *B. vallismortis* B-14891 ab. Anders als mit dem Stamm *Aerobacter indologenes*, den Mickelson und Werkman untersuchten, lässt sich für *B. vallismortis* B-14891 der 2,3-BDO-Titer durch eine pH-Wertänderung kaum steigern. Der Acetoinanteil hingegen steigt. Dies zeigt, dass auch *B. vallismortis* B-14891 mehr Kohlenstoff in den 2,3-BDO-Stoffwechselweg in Abhängigkeit des pH-Wertes schleust. Auf die Nebenproduktbildung hat der pH-Endwert jedoch einen wesentlich größeren Einfluss. Mit dem *A. indologenes*-Stamm konnten die 2,3-BDO-Konzentrationen durch die pH-Wertänderung um den Faktor 3,7 gesteigert und die Bildung von organischen Säuren um ein zehnfaches gesenkt werden. Die Ergebnisse zeigen, dass der Einfluss des pH-Wertes stammspezifisch ist und der optimale Kultivierungs-pH-Wert für die 2,3-BDO-Produktion für jeden Stamm und jedes Substrat gesondert ermittelt werden muss.

4.4.2 Einfluss der Sauerstoffversorgung

Zur Ermittlung einer geeigneten Sauerstoffversorgung zur Kultivierung von *B. vallismortis* B-14891 mit dem Substrat Xylose wurde die Rührerdrehzahl im Reaktor variiert. Die 2,3-BDO- und Acetoinbildung von *B. vallismortis* B-14891 in Abhängigkeit der Rührerdrehzahl wurde in einem DASbox®-Bioreaktorsystem untersucht. Hierfür wurden 6 Kultivierungen bei unterschiedlicher Rührerdrehzahl (100, 200, 300, 400, 500 und 600 rpm) durchgeführt (Abbildung 4.65).

Die lag-Phase betrug bei allen Kultivierungen über 6 h. Anschließend begann der Mikroorganismus mit der Verwertung der Xylose und der Produktbildung. Nach 24 h ist ein Trend erkennbar, dass mit steigender Rührerdrehzahl die Substratverwertung und Produktbildung schneller abläuft als bei geringen Rührerdrehzahlen. Nach 30 h stoppte die Produktbildung mit 600 rpm. Es wurden insgesamt 18,7 g/L 2,3-BDO und 6,7 g/L Acetoin gebildet. Mit allen weiteren Rührerdrehzahlen stieg die Produktbildung bis zum Ende der Kultivierung. Die Xylose wurde bei allen Kultivierungen beinahe vollständig verwertet. Die Kultivierung mit 300 rpm lief insgesamt am effizientesten ab. Nach 30 h wurde in dieser Kultivierung am meisten Xylose verbraucht und Produkt gebildet. Es wurden 27,3 g/L 2,3-BDO und 4,7 g/L Acetoin produziert. Die Produktivität war geringfügig höher als in den weiteren

Kultivierungen. Alle folgenden Kultivierungen mit dem Substrat Xylose wurden daher bei 300 rpm durchgeführt.

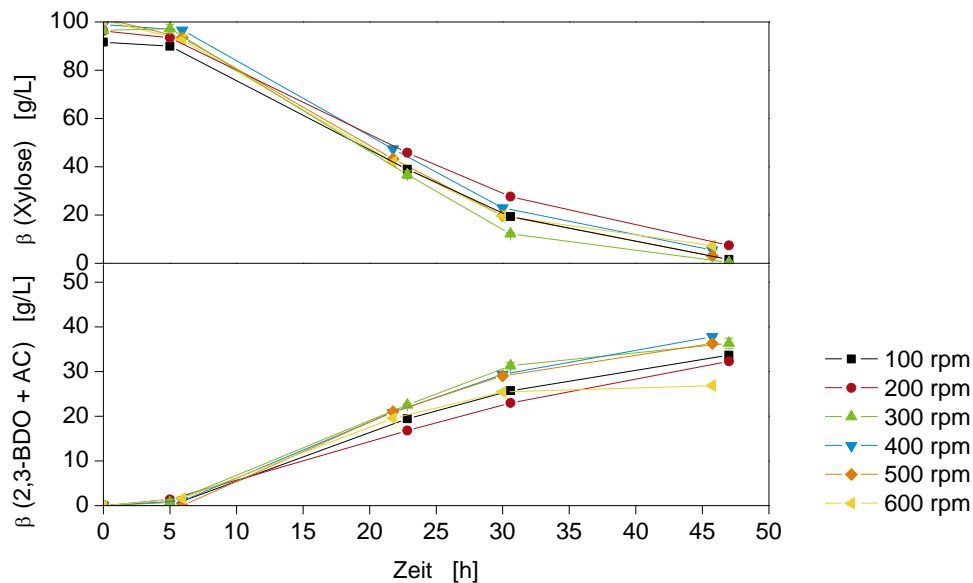


Abbildung 4.65: Xyloseverwertung und Produktbildung (2,3-BDO und Acetoin) in Abhängigkeit der Rührerdrehzahl. Kultivierung von *B. vallismortis* B-14891 im DASbox®-Reaktorsystem mit 100 g/L Xylose. 250 mL Reaktorvolumen, Rührerdrehzahl 100 – 600 rpm, 100 mL Füllvolumen, Temperatur 37 °C, Begasung 25 sL/h, Sauerstoffgehalt 21 %. Freie Säuerung von pH 6,6 ± 0,1 auf pH 5,8 mit anschließender pH-Regelung mit 4 M NaOH auf pH 5,8.

Im Vergleich zu den Kultivierungen mit variierender pH-Endwertregelung wird deutlich, dass der Sauerstoffeintrag einen geringeren Einfluss auf die Kultivierung ausübt, als der pH-Wert (vergl. Kapitel 4.4.1). Der pH-Wert ist somit der entscheidende Faktor für eine effiziente Produktbildung mit dem Substrat Xylose.

4.4.3 Maximale initiale Xylosekonzentration

Die Versuchsreihe zur Bestimmung der maximalen initialen Xylosekonzentration wurde im DASbox®-Reaktorsystem durchgeführt. Das Substrat wurde in Konzentrationen von etwa 100, 120, 140, 170 und 200 g/L eingesetzt.

B. vallismortis B-14891 war in der Lage, 100 g/L Xylose vollständig zu verwerten. Dabei erreichte der Stamm eine Produktkonzentration von 26,9 g/L 2,3-BDO und 10,6 g/L Acetoin. Konzentrationen über 100 g/L Xylose konnten von dem Stamm nicht vollständig verwertet werden. Mit zunehmender Xylosekonzentration stieg die Menge an unverbrauchtem Substrat. Beim Einsatz von initial 200 g/L Xylose verblieben nach 76 h Kultivierung noch 93,9 g/L im Medium. Insgesamt wurden in dieser Kultivierung 34,9 g/L 2,3-BDO und 8,5 g/L Acetoin produziert. Die höchsten Produktkonzentrationen wurden in den Kultivierungen mit 140 und 160 g/L Xylose erzielt. Die 2,3-BDO-Konzentrationen lagen bei 41,4 g/L und 42,1 g/L und die Acetoinkonzentrationen bei 9,4 und 9,7 g/L. Da in allen Kultivierungen mit

Xylosekonzentrationen über 100 g/L die Xylose nicht vollständig verwertet wurde, sind diese Kultivierungen trotz höherer Endkonzentration nicht effizient.

Die optimale initiale Substratkonzentration von *B. vallismortis* B-14891 ist abhängig vom verwendeten Substrat. Mit Glucose lag die maximale initiale Substratkonzentration bei 220 g/L. Mit Xylose hingegen konnten nur Konzentrationen bis 100 g/L verwertet werden.

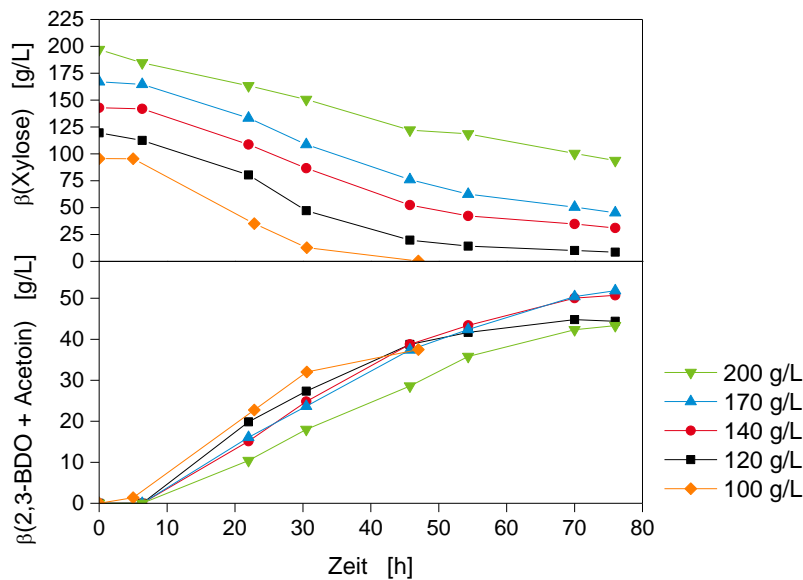


Abbildung 4.66: Substratverbrauch und Produktbildung von *B. vallismortis* B-14891 mit variierender initialer Xylosekonzentration. Kultivierung im DASbox®-Reaktorsystem bei 37 °C, einer Rührergeschwindigkeit von 300 rpm, einer Begasung von 25 sL/h mit Luft und einer freien Säuerung von pH 6,6 ± 0,1 auf pH 5,8 mit anschließender pH-Regelung auf pH 5,8 mit 4 M NaOH.

4.4.4 Referenzkultivierung

Mit den ermittelten Kultivierungsparametern für *B. vallismortis* B-14891 wurde eine Referenzkultivierung mit 100 g/L Xylose durchgeführt.

In der Referenzkultivierung (Abbildung 4.67) wurde die Xylose innerhalb von etwa 34 h vollständig verbraucht. Die extrapolierte Produktkonzentration zum Zeitpunkt der extrapolierten Xyloselimitierung betrug 26,5 g/L 2,3-BDO und 8,7 g/L Acetoin. Die 2,3-BDO-Ausbeute lag bei 0,32 g/g und die Gesamtausbeute bei 0,38 g/g. Die Gesamtproduktivität betrug zum ermitteltem Zeitpunkt der Xyloselimitierung 1,0 g/(L·h). Neben 2,3-BDO und Acetoin wurden 9,8 g/L Nebenprodukte gebildet. Das Nebenproduktspektrum setzte sich aus 6,6 g/L Acetat und 4,6 g/L Succinat zusammen.

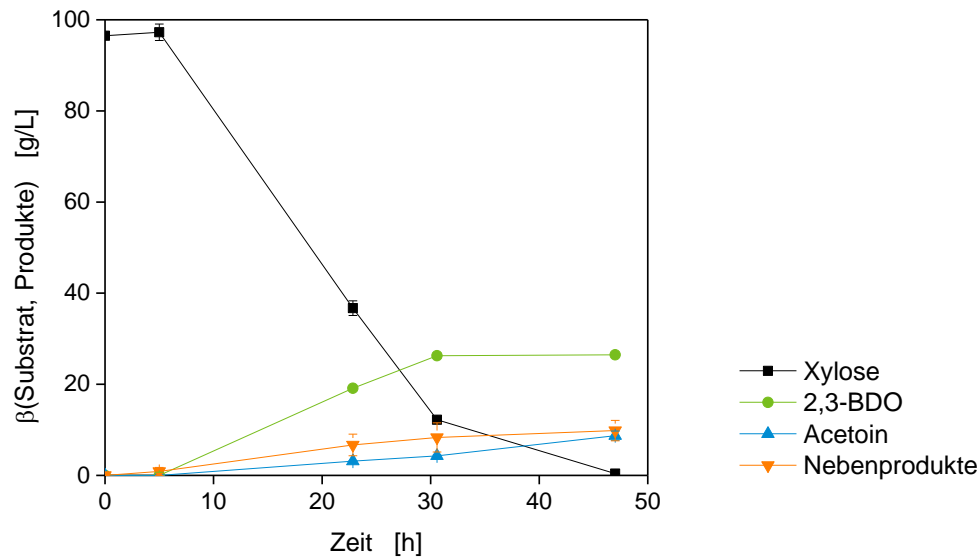


Abbildung 4.67: Referenzkultivierung mit 100 g/L Xylose mit *B. vallismortis* B-14891. Kultivierung im 250 mL Reaktor mit einem Füllvolumen von 100 mL, einer Begasungsrate von 25 sL/h mit Luft, einer Rührerfrequenz von 300 rpm und einer freien Säuerung von pH 6,6 ± 0,1 auf pH 5,8 mit anschließender pH-Regelung auf 5,8 mit 4 M NaOH. Darstellung des Mittelwertes von zwei Kultivierungen.

4.4.5 Fed-Batch-Kultivierung

Xylosekonzentration über 100 g/L werden von *B. vallismortis* B-14891 nicht vollständig verwertet. Um höhere Produkttiter zu erhalten, wurde ein Fed-Batch-Ansatz durchgeführt. Die Xylose wurde zweimal nachgefüttert, wobei die Konzentration unter 100 g/L Xylose gehalten wurde. Die Kultivierung wurde im DASbox®-System durchgeführt. Mit jeder Fütterung wurden etwa 80 g/L Xylose und 1 g/L Hefeextrakt dem Medium in trockener Form zugefügt.

In der Fed-Batch-Kultivierung wurden nach 143 h 75,6 g/L 2,3-BDO und 19,1 g/L Acetoin gebildet (Abbildung 4.68). Innerhalb von 143 h wurden 195,2 g/L Xylose von insgesamt 228,7 g/L verbraucht. Die 2,3-BDO-Ausbeute betrug 0,39 g/g und die Gesamtausbeute lag bei 0,49 g/g. Die Gesamtausbeute lag nahe am theoretischen Maximum von 0,5 g/g. Beinahe der gesamte Kohlenstoff wurde somit in den 2,3-BDO-Stoffwechselweg geschleust. Die Umsatzrate sank mit jedem Feed von 2,7 g/h auf 1,9 g/h und letztlich auf 0,8 g/h. Nach etwa 140 h kam die Fed-Batch-Kultivierung zum Erliegen.

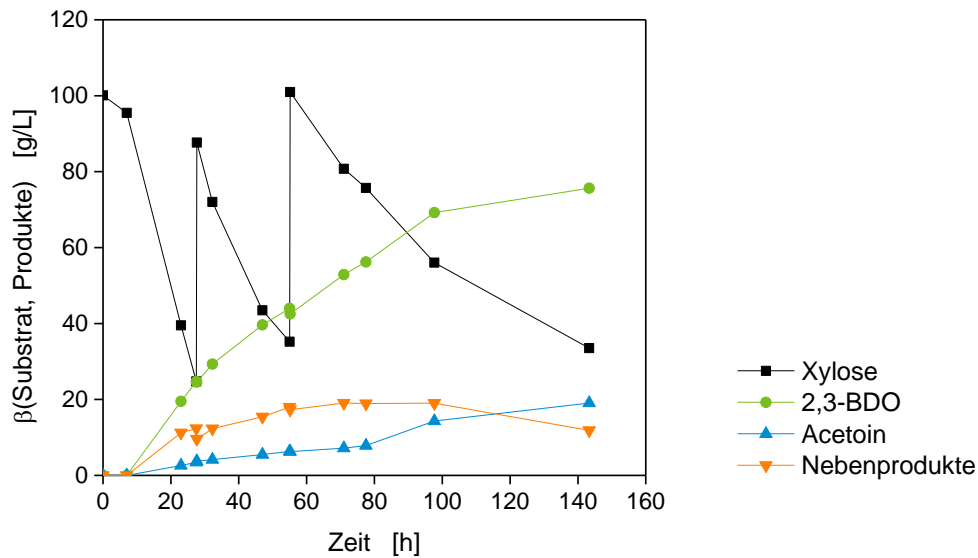


Abbildung 4.68: Fed-Batch-Kultivierung mit *B. vallismortis* B-14891 mit Xylose. Kultivierung im 250 mL Reaktor mit einem Füllvolumen von 100 mL, einer Begasungsrate von 25 sL/h mit Luft, einer Rührerfrequenz von 300 rpm und einer freien Säuerung von pH 6,6 ± 0,1 auf pH 5,8 mit anschließender pH-Regelung auf 5,8 mit 4 M NaOH.

Im Fed-Batch-Ansatz wurden insgesamt 94,7 g/L Produkt gebildet. Soweit bekannt ist dies die höchste Konzentration an 2,3-BDO und Acetoin, die mit einem Risikoklasse-1-Mikroorganismus aus Xylose gebildet wurde. Eine ähnlich hohe Konzentration (87,3 g/L 2,3-BDO und 4,9 g/L Acetoin) wurde mit einem *B. licheniformis*-Stamm erreicht (Li et al. 2014). Das Verhältnis von Acetoin zu 2,3-BDO ist mit dem *B. licheniformis*-Stamm von Li et al. 2014 günstiger als das von *B. vallismortis* B-14891. Weitere Optimierungen mit dem Stamm *B. vallismortis* B-14891 könnten das 2,3-BDO-Acetoin-Verhältnis jedoch verbessern. Ein Vorteil von *B. vallismortis* B-14891 gegenüber dem *B. licheniformis*-Stamm ist, dass dieser höhere initiale Xylosekonzentrationen toleriert. So wurde in dem hier gezeigten Versuch nur 2mal zugefüttert. Der *B. licheniformis*-Stamm hingegen toleriert nur Xylosekonzentrationen bis etwa 55 g/L und es musste 5mal zugefüttert werden, um die hohen Endtiter zu erreichen. Dies ist gleichbedeutend mit einem technisch höheren Aufwand.

4.5 Kultivierungen mit einem Hemicellulose-Hydrolysat aus Birkenholz

Die biotechnische Produktion von 2,3-BDO mit *B. vallismortis* B-14891 wurde mit einem Hemicellulose-Hydrolysat aus Birkenholz untersucht. Für die Versuche wurde ein Hydrolysat verwendet, dass von der Lappeenranta University of Technology zur Verfügung gestellt wurde (siehe Kapitel 3.6.4). Im Vorfeld zur biotechnischen Umsetzung des Hydrolysates wurden die drei Fraktionen (Hydrolysat, Ultrafiltrat und Nanofiltrat) hinsichtlich der Zucker-, Nebenprodukt- und Spurenelementkonzentration charakterisiert.

Die Anteile der Ionen und die Ionenstärke der Hydrolysate wird als nicht kritisch für die Kultivierung von *B. vallismortis* B-14891 betrachtet und daher nicht weiter diskutiert. Die Daten sind in Tabelle A 5 dargestellt.

Soweit bekannt sind auch die Spurenelemente, mit Ausnahme von Zink, in einer nicht hemmenden Konzentration enthalten. Zink wird ab einer Konzentration von 1 mg/L in der Literatur als Inhibitor für die BDH beschrieben (Zhang et al. 2014). In den Hydrolysatfraktionen sind bis zu 14 mg/L Zink enthalten (Tabelle A 6).

4.5.1 Zuckerkonzentration in den Hydrolysatfraktionen

In Tabelle 4.20 sind die Konzentrationen der enthaltenden Zuckermonomere nach enzymatischem Aufschluss der einzelnen Fraktionen dargestellt.

Tabelle 4.20: Zuckermonomere in den drei Fraktionen des Hemicellulose-Hydrolysats nach enzymatischem Aufschluss.

Monosaccharid	<u>Hydrolysat:</u> Konzentration [g/L]	<u>Ultrafiltrat:</u> Konzentration [g/L]	<u>Nanofiltrat:</u> Konzentration [g/L]
Arabinose	0,7	0,6	2,2
Galactose	0,6	0,7	1,8
Glucose	0,9	3,0	1,9
Rhamnose	0,5	0,7	1,6
Xylose	17,1	87,1	57,5
Summe	19,8	92,1	65,0

Die drei Fraktionen unterscheiden sich im Zuckergehalt und in der Zuckerzusammensetzung. Im Ausgangshydrolysat sind 19,8 g/L Zucker enthalten. Die UF und NF-Konzentrate enthalten 92,1 und 65,0 g/L Zuckermonomere. Ab einer Zuckerkonzentration von 50 g/L lassen sich Aussagen über die Verwertbarkeit und die inhibitorische Wirkung treffen. Beide Konzentrate sind daher für die weiteren Untersuchungen geeignet.

Vom Ultra- und Nanofiltrat wurde zusätzlich ein Säureaufschluss der Hemicellulose durchgeführt (Tabelle 4.21). Mit diesem Aufschluss wurde der maximale Zuckergehalt der Filtrate bestimmt. Mit der maximalen Zuckerkonzentration der Filtrate kann die Effizienz vom enzymatischen Aufschluss bestimmt werden. Parallel zu den Säureaufschlüssen der Filtrate wurde ein Aufschluss eines Zuckerreferenzstandards durchgeführt (siehe Kapitel 3.6.2). Mit dem Standard wurde ermittelt, dass während des Säureaufschlusses etwa 7,4 g/L Zucker verloren gehen bzw. weiter umgesetzt werden. Im Ultrafiltrat sind unter Einbezug der Verluste bis zu 103,4 g/L Zucker enthalten und im Nanofiltrat 86,2 g/L. Mit diesen Werten wurde die Ausbeute nach dem enzymatischen Aufschluss für das Ultra- und Nanofiltrat berechnet. Mit dem Ultrafiltrat liegt die Ausbeute bei 89 % und mit dem Nanofiltrat bei 75 %. Die enzymatische Hydrolyse war mit beiden Filtraten relativ gut und wurde daher als Aufschlussmethode gewählt.

Tabelle 4.21: Zuckermonomere im Ultra- und Nanofiltrat nach Säurehydrolyse.

Monosaccharid	<u>Ultrafiltrat:</u> Konzentration [g/L]	<u>Nanofiltrat:</u> Konzentration [g/L]
Arabinose	0,0	2,0
Galactose	0,0	0,0
Glucose	4,8	2,3
Rhamnose	1,8	2,8
Xylose	89,4	71,7
Summe	96,0	78,8

4.5.2 Nebenproduktanalyse der Hydrolysatfraktionen

Die drei Fraktionen des Hydrolysats wurden auf den Gehalt bekannter Nebenprodukte untersucht. Die Untersuchung erfolgte ohne eine weitere Vorbehandlung der Hydrolysate mittels HPLC-Analyse.

Die Konzentrationen der Nebenprodukte in den drei Hydrolysaten unterschieden sich von denen im synthetischen Hydrolysat aus dem Screening (vergl. Tabelle 4.22 und Kapitel 3.3.10). Das synthetische Hydrolysat war den Nebenproduktkonzentrationen aus Literaturdaten von Jurchescu 2014 nachempfunden. In den drei Hydrolysatfraktionen in dieser Arbeit konnten keine 4-Hydroxybenzoesäure, Ameisensäure und kein Vanillin nachgewiesen werden. Die Syringaldehydkonzentration in den UF- und NF-Konzentraten war etwa 10mal höher und die Furfuralkonzentration etwa 7mal höher als im synthetischen Hydrolysat. Die Konzentrationen an 5-HMF entsprachen etwa der Konzentration der getesteten synthetischen Hydrolysate.

Acetat konnte im UF und NF nicht eindeutig nachgewiesen werden, da es zu Matrixüberlagerungen mit der verwendeten HPLC-Methode kam. Die Hemmstoffanalyse erfolgte ohne Vorbehandlung. Die Abspaltung von Acetat erfolgt zum Großteil erst bei der Hydrolyse der Hemicellulose. Die Acetatkonzentrationen im UF und NF wurden daher nochmals nach einem enzymatischen Aufschluss bestimmt. Zur Bestimmung der Acetatkonzentration wurde die Methode der Standardaddition gewählt, um die Konzentrationen genau zu ermitteln und Matrixeffekte zu kompensieren. Nach dem Aufschluss waren im Ultrafiltrat 19,9 g/L und im Nanofiltrat 14,1 g/L Acetat enthalten.

Tabelle 4.22: Nebenproduktkonzentrationen in den drei Hydrolysatfraktionen.

Nebenprodukt der Heißwasserextraktion	<u>Hydrolysat:</u> Konzentration [g/L]	<u>Ultrafiltrat:</u> Konzentration [g/L]	<u>Nanofiltrat:</u> Konzentration [g/L]
Acetat	0,21	19,9 [*]	14,1 [*]
Furfural	0,77	0,71	0,81
5-Hydroxymethylfurfural	0,10	0,13	0,13
4-Hydroxybenzoesäure	n.d.	n.d.	n.d.
Ameisensäure	n.d.	n.d.	n.d.
Syringaldehyd	n.d.	0,17	0,29
Vanillin	n.d.	n.d.	n.d.

* nach enzymatischem Aufschluss

n.d. - nicht detektiert

4.5.3 Einfluss einzelner Nebenprodukte auf die 2,3-Butandiolproduktion

Im Folgenden wurde der Einfluss der nachgewiesenen Nebenprodukte auf die 2,3-BDO-Produktion mit *B. vallismortis* B14891 untersucht. Hierfür wurden die einzelnen Substanzen in verschiedenen Konzentrationsstufen dem Basal-HE-Medium zugefügt. Als Referenz diente eine Kultivierung im Basal-HE-Medium ohne Nebenprodukte.

Acetat:

Durch den Zusatz von bis zu 10 g/L Acetat, wurden die Produktivitäten und Ausbeuten im Vergleich zur Referenz aktiviert (Abbildung 4.69 und Tabelle 4.23). Ab Konzentrationen von 20 g/L Acetat war eine Inhibierung der Produktbildung zu erkennen. Gegenüber der Referenz sank die Produktivität von 0,63 g/(L·h) auf 0,59 g/(L·h) und die Produktausbeute von 0,34 g/g auf 0,17 g/g. Mit 40 g/L zusätzlichem Acetat im Medium fand kaum noch eine Produktbildung statt.

Die Ergebnisse decken sich mit Angaben aus der Literatur (Thomson und Booth 1983, Blomqvist 1993, de Mas et al. 1988, Xiao und Xu 2007). So wirkt Acetat in geringen Konzentrationen als Aktivator für den 2,3-BDO-Stoffwechselweg. Mit steigenden Konzentrationen inhibiert Acetat jedoch das Wachstum und die Produktbildung (Frazer und McCaskey 1991, Maddox 1996).

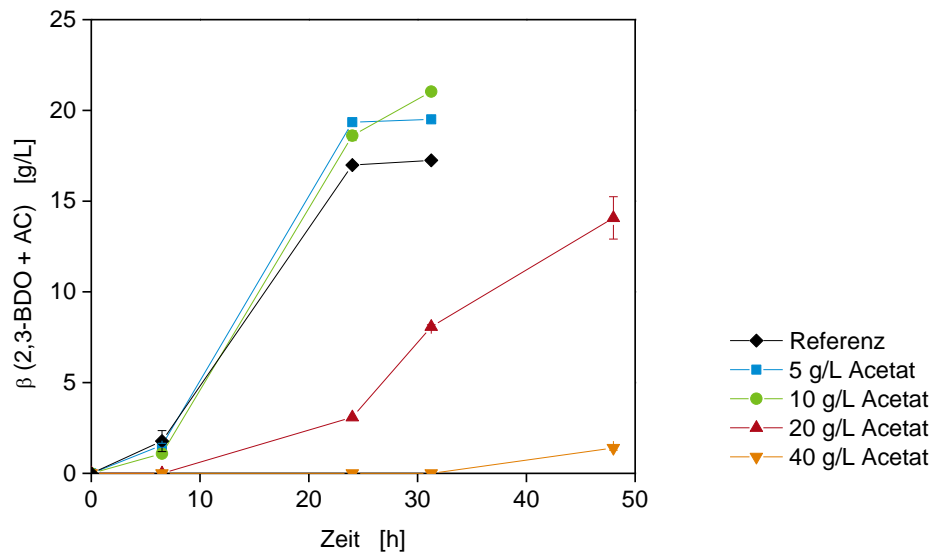


Abbildung 4.69: Einfluss der Acetatkonzentration im Basal-HE-Medium auf die Produktbildung (2,3-BDO und Acetoin) von *B. vallismortis* B-14891. Kultivierung in 96-Well MTP bei 37 °C, 700 rpm, einem Füllvolumen von 200 µL mit 50 g/L Xylose. Mittelwerte aus zwei Kultivierungen.

Tabelle 4.23: Einfluss der Acetatkonzentration im Basal-HE-Medium auf die Produktivitäten und Produktausbeuten (2,3-BDO und Acetoin) von *B. vallismortis* B-14891. Kultivierung in 96-Well MTP bei 37 °C, 700 rpm, einem Füllvolumen von 200 µL mit 50 g/L Xylose für 24 h. Mittelwerte aus zwei Kultivierungen.

Acetat [g/L]	Produktivität nach 24 h [g/(L·h)]	Ausbeute nach 24 h [g/g]
Referenz	0,63	0,34
5	0,73	0,38
10	0,73	0,36
20	0,59	0,17
40	-	-

Furfural:

In Abbildung 4.70 ist die Produktbildung von *B. vallismortis* B-14891 in Abhängigkeit der Furfuralkonzentration dargestellt. Furfural übt bis zu einer Konzentration von 0,36 g/L keine inhibitorische Wirkung aus. Ab einer Konzentration von 0,71 g/L ist die Produktbildung verzögert. Dies ist die Konzentration, die im UF vorliegt. Die maximal erreichte Endproduktkonzentration wird durch das zugefügte Furfural nicht beeinflusst. Bei einer Verdoppelung der Konzentration auf 1,42 g/L ist die Inhibierung stärker ausgeprägt, aber auch hier wurde nach 30 h Kultivierung dieselbe Endkonzentration an 2,3-BDO und Acetoin erreicht wie in der Referenzkultivierung.

Frazer und McCaskey untersuchten 1991 den Einfluss von Furfural auf die 2,3-BDO Produktion von *K. pneumoniae* 1-D3. Eine Furfuralkonzentration von 0,5 g/L führte zu einer verminderten 2,3-BDO-Produktion. Die Ausbeute fiel bei 0,5 g/L Furfural von 0,41 g/g auf 0,36 g/g. Eine weitere Erhöhung der Furfuralkonzentration hatte jedoch keinen weiteren Einfluss auf die Produktion. Nishikawa et al. 1988 berichten über den Einfluss von Furfural auf *K. pneumoniae* NRCC 3006. Es konnte eine Inhibition ab einer Konzentration von 0,4 g/L festgestellt werden. Durch eine weitere Erhöhung der Konzentration wurden das Wachstum und die Produktbildung komplett gehemmt. *B. vallismortis* B-14891 weist gegenüber Furfural eine höhere Resistenz auf als die Vergleichsstämme aus der Literatur. Zwar sank die Produktivität von *B. vallismortis* B-14891 mit steigender Furfuralkonzentration, die Ausbeute blieb bei den getesteten Konzentrationen bis 1,42 g/L Furfural jedoch in etwa gleich.

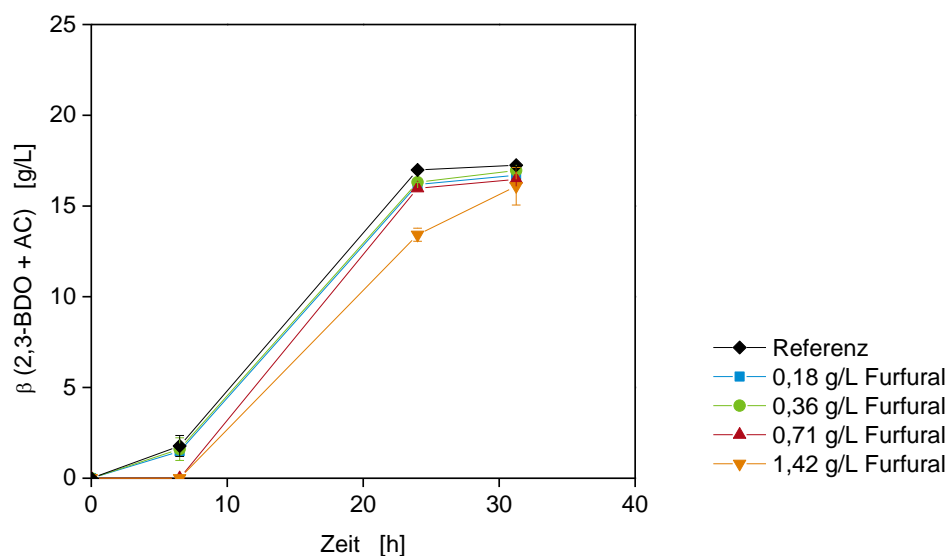


Abbildung 4.70: Einfluss der Furfuralkonzentration im Basal-HE-Medium auf die Produktbildung (2,3-BDO und Acetoin) von *B. vallismortis* B-14891. Kultivierung in 96-Well MTP bei 37 °C, 700 rpm, einem Füllvolumen von 200 µL mit 50 g/L Xylose.

5-Hydroxymethylfurfural

5-HMF hatte keine signifikante Wirkung auf den Kultivierungsverlauf und die Produktbildung von *B. vallismortis* B-14891 (Abbildung 4.71). Am ersten Messpunkt nach 6,5 h, waren leichte Varianzen in der Produktbildung erkennbar. Dies ist ein Hinweis auf eine verlängerte lag-Phase.

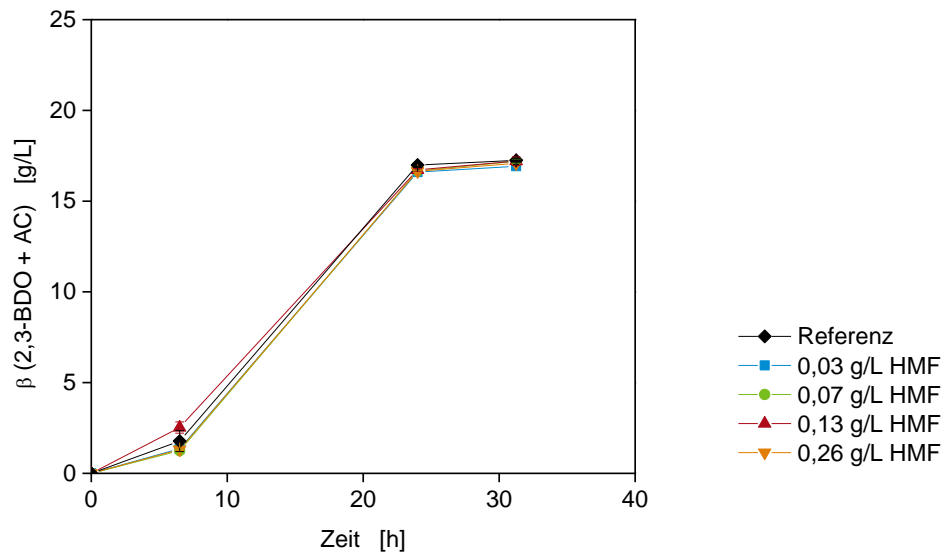


Abbildung 4.71: Einfluss der 5-HMF-Konzentration im Basal-HE-Medium auf die Produktbildung (2,3-BDO und Acetoin) von *B. vallismortis* B-14891. Kultivierung in 96-Well MTP bei 37 °C, 700 rpm, einem Füllvolumen von 200 µL mit 50 g/L Xylose.

Syringaldehyd:

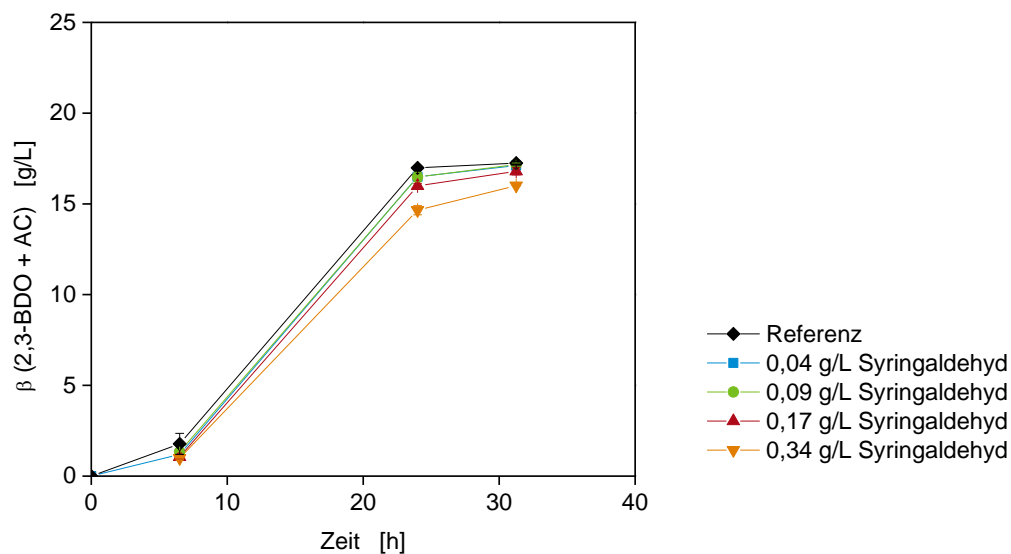


Abbildung 4.72: Einfluss der Syringaldehydkonzentration im Basal-HE-Medium auf die Produktbildung (2,3-BDO und Acetoin) von *B. vallismortis* B-14891. Kultivierung in 96-Well MTP bei 37 °C, 700 rpm, einem Füllvolumen von 200 µL mit 50 g/L Xylose.

Syringaldehyd übt ab einer Konzentration von 0,17 g/L eine leichte Inhibierung auf *B. vallismortis* B-14891 aus (Abbildung 4.72). Ab einer Konzentration von 0,04 g/L Syringaldehyd vermindern sich die Produktivitäten und es ist eine leichte Verzögerung der lag-

Phasen zu erkennen. Mit steigender Syringaldehydkonzentration nimmt die Produktivität sukzessive ab (Tabelle 4.24).

Tabelle 4.24: Einfluss der Syringaldehydkonzentration im Basal-HE-Medium auf die Produktivitäten (2,3-BDO und Acetoin) von *B. vallismortis* B-14891. Kultivierung in 96-Well MTP bei 37 °C, 700 rpm, einem Füllvolumen von 200 µL mit 50 g/L Xylose für 24 h. Mittelwerte der Referenz aus 10 Messungen und der Proben aus zwei Messungen.

Syringaldehyd [g/L]	Produktivität nach 24 h [g/(L·h)]
Referenz	0,64
0,04	0,64
0,09	0,63
0,17	0,62
0,34	0,57

Zink:

Zhang et al. 2014 beschreibt einen inhibitorische Wirkung ab 1 mg/L Zink auf die BDH. Im Hydrolysat wurden bis zu 14 mg/L Zink nachgewiesen (Tabelle A 6). Der Einfluss von Zink wurde daher untersucht. Durch die Zugabe von Zink zeigt sich kein inhibitorischer Effekt. Insgesamt wirkt sich die Zugabe von Zink positiv auf die Produktbildung aus (Abbildung 4.73). Die Hemmstoffversuche von Zhang et al. 2014 mit Zink erfolgten mit einer isolierten BDH. In dieser Studie übte Zink eine starke Inhibierung ab 1 mg/L aus. Bei den nicht isolierten Enzymen in dieser Arbeit konnte jedoch kein negativer Effekt beobachtet werden. Die Ausbeuten und Produktivitäten wurden durch die Zugabe von Zink leicht gesteigert.

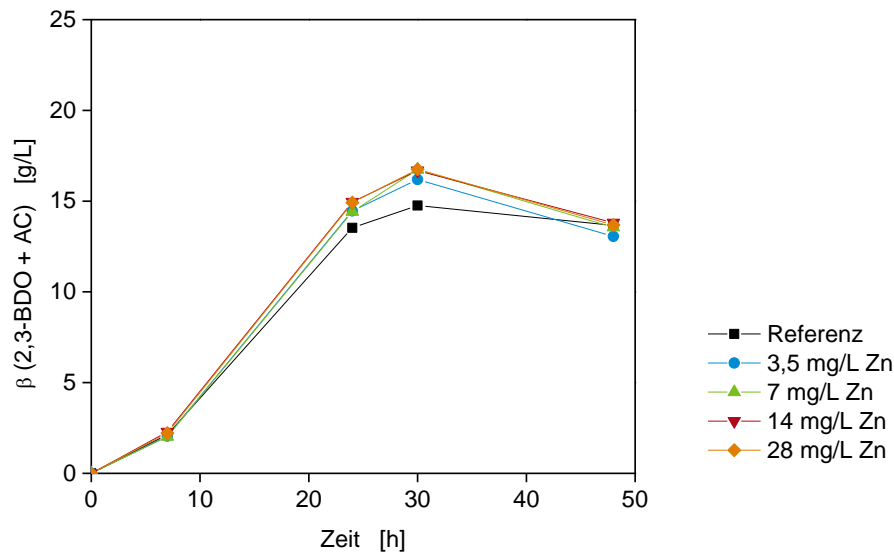


Abbildung 4.73: Einfluss der Zinkkonzentration im Basal-HE-Medium auf die Produktbildung (2,3-BDO und Acetoin) von *B. vallismortis* B-14891. Kultivierung in 96-Well MTP bei 37 °C, 700 rpm, einem Füllvolumen von 200 µL mit 50 g/L Xylose.

Die Konzentrationen der identifizierten Nebenprodukte aus dem UF und NF üben zum Großteil keinen oder nur einen geringen Einfluss auf die Produktbildung aus. Die Furfuralkonzentrationen, die im UF- und NF-Konzentrat vorliegen, wirken sich leicht negativ auf die lag-Phase aus, nicht aber auf die Ausbeute und den Endtiter. Den größten negativen Einfluss hat Acetat. Durch die Zugabe von Konzentrationen ab 20 g/L Acetat wird die Produktivität und Ausbeute stark negativ beeinflusst.

4.5.4 Untersuchung von Kreuzinhibitionen

Im Anschluss an die Kultivierungen mit den einzelnen Holz-Hydrolysatnebenprodukten wurde ein synthetisches UF und NF hergestellt. Mit den synthetischen Hydrolysaten wurde die Kreuzinhibition durch Acetat, Furfural, 5-HMF und Syringaldehyd getestet. Zusätzlich wurde das Kultivierungsverhalten von *B. vallismortis* B-14891 mit den realen Filtraten untersucht.

Die Hemicellulose im Ultra- und Nanofiltrat wurde enzymatisch hydrolysiert und die Hydrolysate nach dem Aufschluss über einen Kationentauscher gereinigt (siehe Kapitel 3.6.4). Nach der Vorbehandlung wurden den Hydrolysaten alle Makroelemente zugesetzt, die im Basal-HE-Medium enthalten sind. An Spurenelementen wurden Nicotinsäure und Na-EDTA zugesetzt. Die synthetischen und realen Hydrolysate wurden zusätzlich mit 0,1 M MES auf pH 6,6 ± 0,1 gepuffert.

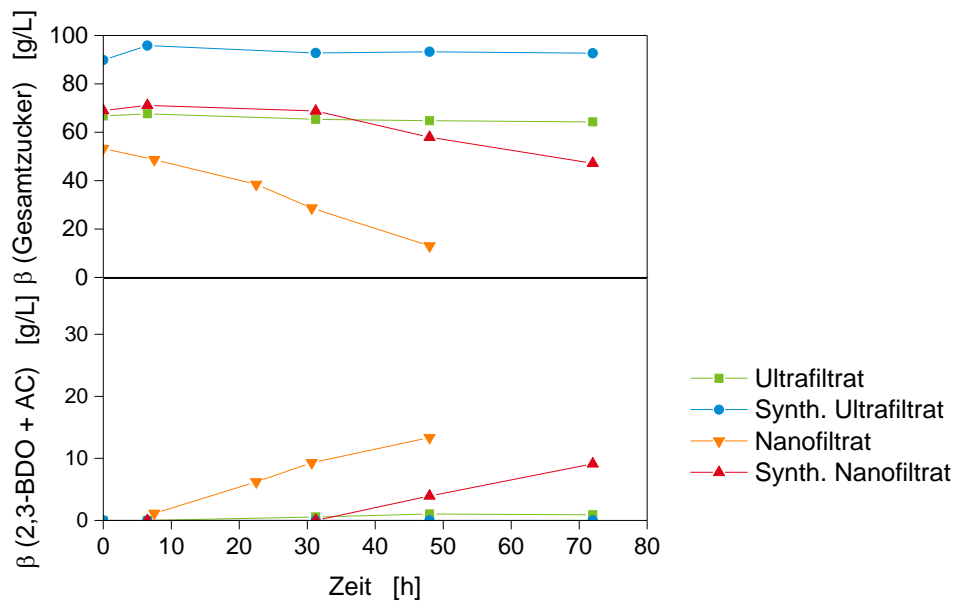


Abbildung 4.74: 2,3-BDO-Produktion von *B. vallismortis* B-14891 in synthetischem und realem Ultra- und Nanofiltrat. Kultivierung in 24-Well MTP mit einem Füllvolumen von 1 mL, bei 37 °C und 320 rpm. Der Start-pH-Wert betrug $6,6 \pm 0,1$. Mittelwerte von zwei Kultivierungen.

In Abbildung 4.74 sind die Kultivierungsverläufe von *B. vallismortis* B-14891 im realen und synthetischen UF und NF. Die Kultivierung unter Verwendung des realen und synthetischen UFs war nicht möglich. In beiden Ansätzen wurde kein Zucker verwertet, es wurde kein Produkt gebildet und es fand kein Wachstum statt.

Im synthetischen NF wurden die Zucker verwertet und Produkt gebildet. Die lag-Phase war in diesem Ansatz deutlich ausgebildet und die Zuckerverwertung startete erst nach etwa 30 h. Im realen NF hingegen war die lag-Phase nicht sehr ausgeprägt. Die Zuckerverwertung und die Produktbildung setzten bereits nach etwa 8 h ein. Im realen NF war dadurch die Produktivität mit 0,28 g/(L·h) höher als im synthetischen NF mit 0,13 g/(L·h). Das bessere Wachstum im realen NF könnte durch die Aufreinigung des Hydrolysates mit dem Kationentauscher verursacht worden sein, wodurch inhibierende Substanzen entfernt wurden. Im NF könnten zudem noch weitere nicht identifizierte Substanzen vorliegen, deren Einflüsse auf die Kultivierung nicht bekannt sind. Es ist möglich, dass neben den hemmenden Substanzen auch aktivierende Substanzen im Hydrolysat enthalten waren.

4.5.5 Detoxifizierung vom Ultra- und Nanofiltrat

Eine direkte Verwertung der Hydrolysate ist aufgrund der inhibierenden Wirkung nicht möglich. Bei der Untersuchung der hemmenden Substanzen wirkte sich besonders Acetat inhibierend auf die Kultivierung aus. Das Acetat sollte daher aus den Hydrolysaten entfernt bzw. auf eine nicht hemmende Konzentration reduziert werden.

4.5.5.1 Detoxifizierung mittels Anionentauscher und Umkehrphase

Zur Reduzierung der Acetatkonzentration wurden verschiedene Anionentauscher und eine RP-Phase eingesetzt. Die Proben sowie die beiden Waschfraktionen (siehe Kapitel 3.6.5) wurden mittels HPLC auf Zucker- und Acetatgehalt untersucht.

In Abbildung 4.75 ist die normierte Wiederfindungsrate von Xylose und Acetat nach der Detoxifizierung mittels Anionentauscher bzw. der RP-Phase dargestellt. Hierfür wurden die Gehalte der Probe, Waschfraktion 1 und Waschfraktion 2 addiert und die Werte mittels der Referenz normiert. Die Gehalte in den einzelnen Fraktionen sind in Abbildung A 5 dargestellt.

Mit den Tauschern Amberlite IRA-96 und Amberlyst A21 findet sich der gesamte Zucker, verteilt auf die drei Fraktionen, wieder. Der Acetatgehalt wurde mit dem Amberlite IRA-96 Tauscher um 15 % reduziert und mit dem Amberlyst A21 um etwa 9 %. Mit dem Dowex 66 Tauscher wurde das meiste Acetat zurückgehalten (23,5 %). Etwa 4 % der Xylose gingen verloren.

Mit dem Lewatit-Austauscher war die normierte Wiederfindungsrate für Acetat 100 % und für Xylose 83,1 %. Dieser Tauscher ist für die Acetatentfernung, aufgrund der geringen Affinität des Acetats zum Tauschermaterial, ungeeignet.

In der RP-Phase nahm der Xylose- und Acetatanteil zu gleichen Teilen, jeweils um etwa 8 – 9 %, ab. Auch die RP-Phase ist für die Acetatdetoxifizierung ungeeignet.

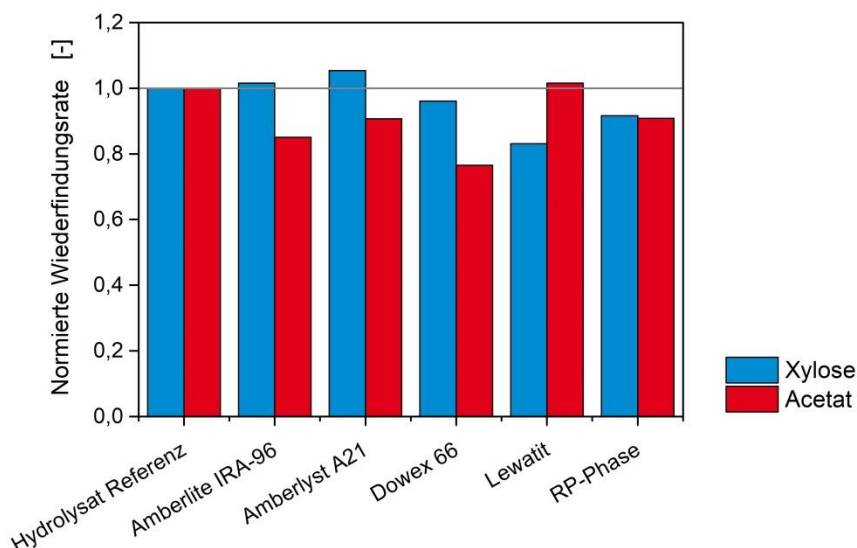


Abbildung 4.75: Normierte Wiederfindungsrate von Xylose und Acetat der zusammenaddierten Anionentauscherproben mit den jeweiligen Waschfraktionen.

Durch die Anwendung der Anionentauscher und die RP-Phase haben sich die Hydrolysate teilweise entfärbt (Abbildung 4.76). Die Entfärbung durch die RP Phase war geringer, als die durch die Anionentauscher. Die Entfärbung zeigt, dass nicht identifizierte Substanzen

(phenolische Komponenten) aus dem Hydrolysat entfernt wurden. Acetat hat eine relativ schwache negative Ladung. Die nicht identifizierten Substanzen könnten mit dem Acetat um die Tauscherplätze konkurriert haben, weshalb die Entfernung des Acetats nur teilweise möglich war. Für eine effizientere Acetatentfernung wäre es denkbar, die Proben weiter zu verdünnen und damit die Ionenstärke der Hydrolysate zu senken. Da die Proben durch die Anionentauscheranwendung bereits 1:20 verdünnt wurden, ist dieses Vorgehen, für eine biotechnische Nutzung der Hydrolysate, jedoch nicht zweckmäßig.

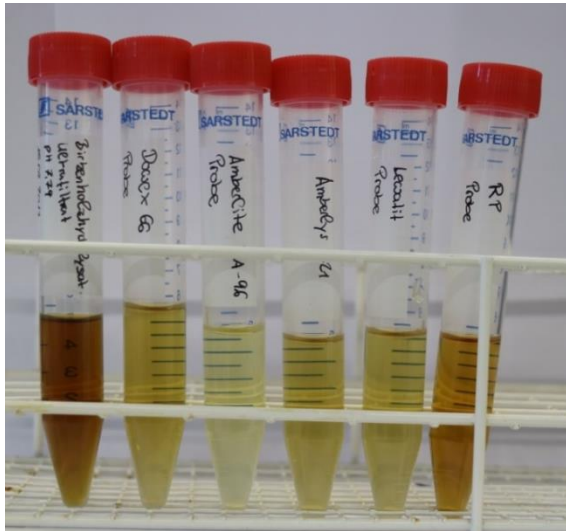


Abbildung 4.76: Färbung der UF-Proben (von links nach rechts: Referenz, Dowex 66, Amberlite IRA-96, Amberlyst A21 Lewatit VP OC 1065 und RP-Phase) nach Anwendung der Anionentauscher bzw. der RP-Phase.

4.5.5.2 Detoxifizierung mittels flüssig-flüssig-Extraktion

In einer weiteren Versuchsreihe sollte das Acetat mittels flüssig-flüssig-Extraktion aus dem Hydrolysat entfernt werden. Hierfür wurden 500 μL UF-Hydrolysat mit 400 μL eines organischen Lösungsmittels vermischt und durchmischt. Der pH-Wert des Ultrafiltrats lag bei etwa 2,1. Nach der Phasentrennung wurde die organische Phase verworfen. Die Proben wurden auf ihren Zucker- und Acetatgehalt untersucht. Als organische Lösungsmittel wurden Ethylacetat, MEK, MTBE, n-Octanol und stabilisierter Diethylether verwendet.

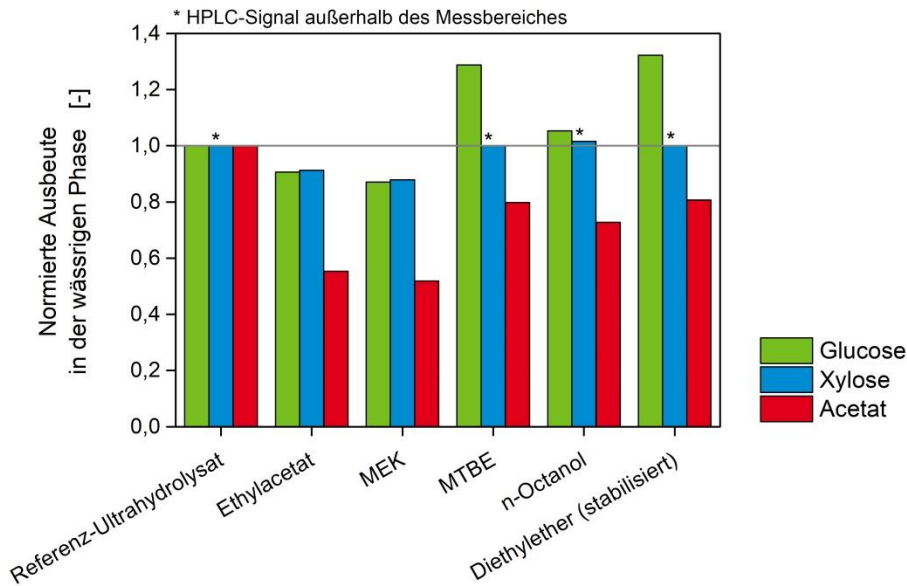


Abbildung 4.77: Acetat-, Glucose- und Xylosekonzentrationen nach einer flüssig-flüssig-Extraktion mit verschiedenen organischen Lösungsmitteln.

Mittels flüssig-flüssig-Extraktion war eine Reduzierung des Acetatgehalts möglich (Abbildung 4.77). Mit Ethylacetat und MEK als organische Phase wurden 48,0 bzw. 47,5 % Acetat aus dem UF-Hydrolysat extrahiert. In beiden Extraktionen nahm auch der Zuckergehalt um etwa 12 % ab. Mit dem Lösemittel MEK wurde in der HPLC-Analyse ein zusätzlicher Peak detektiert, der zeigt, dass die Phasentrennung nicht vollständig war und Lösemittel im Hydrolysat verblieb (Daten nicht gezeigt). MEK und Ethylacetat sind daher als Extraktionsmittel nicht oder nur teilweise geeignet.

Mit MTBE, n-Octanol und stabilisiertem Diethylether als organische Phase fand eine Konzentrierung der Glucose statt. Die Konzentrierung wird dadurch verursacht, dass sich Wasser in dem organischen Lösungsmittel löst. Die Xylosegehalte lagen, aufgrund einer zu geringen Verdünnung, außerhalb des Messbereichs im RI-Detektor und konnten nicht quantifiziert werden.

Der stabilisierte Diethylether mischte sich teilweise mit dem UF-Hydrolysat. In der HPLC-Analyse zeigte sich dies durch einen unbekannten Peak. Diethylether wurde daher als organische Phase ausgeschlossen.

Die Extraktionen mit MTBE und n-Octanol schienen am zweckmäßigsten zu sein. Mit diesen organischen Lösungsmitteln wurden weitere Versuche durchgeführt. Hierfür wurden 300 µL Probe mit 600 µL Solvent vermischt und gemischt. Die organische Phase wurde verworfen. Die Extraktion wurde 3mal wiederholt.

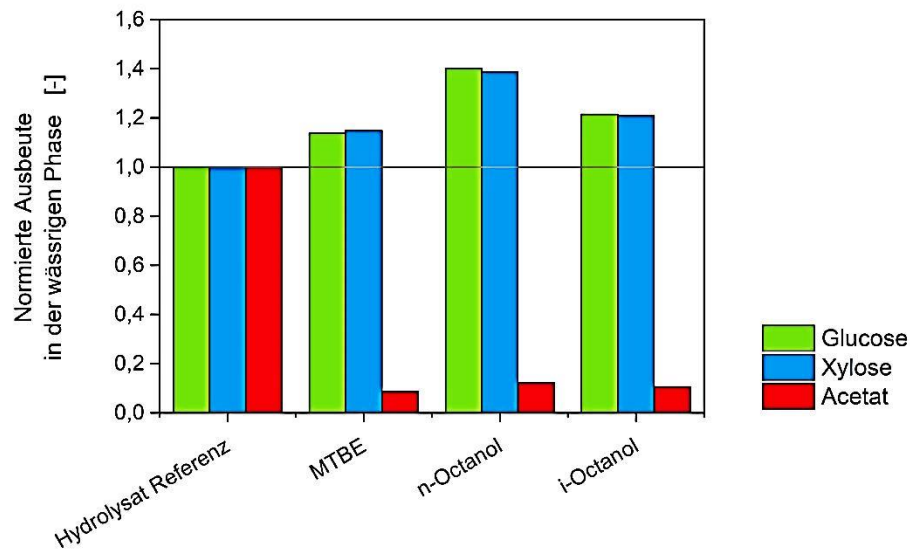


Abbildung 4.78: Normierte Acetat-, Glucose- und Xyloseausbeuten nach einer flüssig-flüssig-Extraktion mit UF-Hydrolysat und MTBE, n- und i-Octanol als organische Phase.

Mit MTBE, n- und i-Octanol konnte das Acetat jeweils um etwa 90 % reduziert werden. Der Zuckeranteil im Ultrafiltrat wurde durch den Wasserentzug durch die organische Phase konzentriert. Durch die Extraktion mit MTBE, n- und i-Octanol nahm der Zuckergehalt um etwa 15, 39 und 21 % zu. Mit n- und i-Octanol fand keine klare Phasentrennung statt, es bildete sich eine Emulsion, die über mehrere Stunden stabil war. Diese Lösungsmittel eignen sich daher nur bedingt für die Extraktion. Die beste Acetatreduzierung erfolgte mit MTBE.

4.5.6 Batch Kultivierung mit Birkenholz-Hemicellulose-Hydrolysat

Die Acetatreduzierung vom Ultra- und Nanofiltrat wurde mittels flüssig-flüssig-Extraktion mit MTBE als organische Phase durchgeführt. Mittels HPLC-Analyse wurde die Acetatkonzentration nach der Detoxifizierung ermittelt. Im Nanofiltrat befanden sich noch 5,7 g/L Acetat und im Ultrafiltrat konnten 1,9 g/L Acetat nachgewiesen werden. In beiden Fällen lag die Acetatkonzentration unterhalb der inhibierenden Konzentration (vergl. Kapitel 4.5.3).

Die Kultivierungen mit dem detoxifizierten Ultra- und Nanofiltrat fanden im DASbox®-Bioreaktorsystem statt. Den Hydrolysaten wurden zusätzlich alle essentiellen Medienbestandteile zugesetzt.

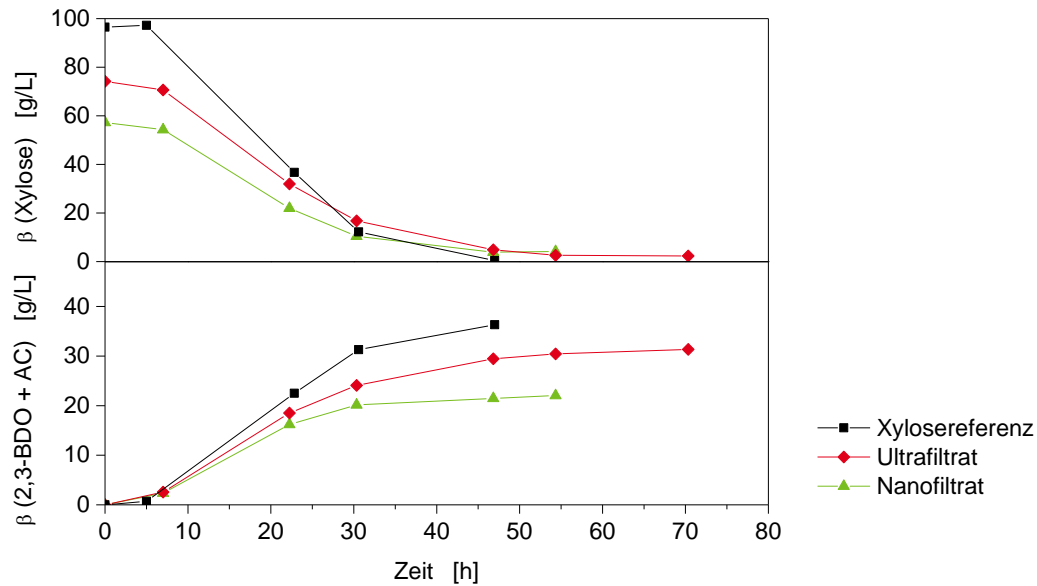


Abbildung 4.79: Kultivierung von *B. vallismortis* B-14891 mit acetatreduziertem Ultra- (rot) und Nanofiltrat (grün) als Substrat sowie mit reiner Xylose als Substrat (schwarz). Kultivierung im 250 mL Reaktor mit einem Füllvolumen von 100 mL, einer Begasungsrate von 25 sL/h mit Luft, einer Rührerfrequenz von 300 rpm und einer freien Säuerung von pH $6,6 \pm 0,1$ auf 5,8 und anschließender pH-Regelung auf pH 5,8 mit 4 M NaOH.

Die Umsetzung der Zucker setzte in beiden acetatreduzierten Hydrolysaten nach etwa 8 h Kultivierung ein. Nach etwa 47 h war der Zucker zum Großteil verbraucht und die maximalen Produktkonzentrationen erreicht (Abbildung 4.79). Im Ultrafiltrat betrug die Produktkonzentration 22,7 g/L 2,3-BDO und 6,8 g/L Acetoin. Die Produktivität lag nach 47 h bei 0,63 g/(L·h) mit einer Ausbeute von 0,43 g/g. Im nicht aufgereinigten Ultrafiltrat war *B. vallismortis* B-14891 nicht in der Lage, den Zucker zu verwerten (vergl. Abbildung 4.74). Durch die Reduzierung des Acetats von 19,9 g/L auf 1,9 g/L, konnte der Zucker von *B. vallismortis* B-14891 vollständig verwertet werden und zu 2,3-BDO und Acetoin umgesetzt werden (Abbildung 4.79).

Mit dem nicht gereinigten Nanofiltrat war zwar ein Umsatz des Zuckers möglich, jedoch bei einer relativ geringen Produktivität von 0,28 g/(L·h) nach 48 h (vergl. Abbildung 4.74). Mit dem detoxifizierten Nanofiltrat wurden 15,3 g/L 2,3-BDO und 6,2 g/L Acetoin produziert und die Produktivität lag bei 0,46 g/(L·h) nach 47 h.

Durch die normierte Darstellung der Kultivierungen wird deutlich, dass die Zuckerverwertung und Produktbildung mit den detoxifizierten Filtraten gleich zur Verwertung reiner Xylose verläuft (Abbildung 4.80).

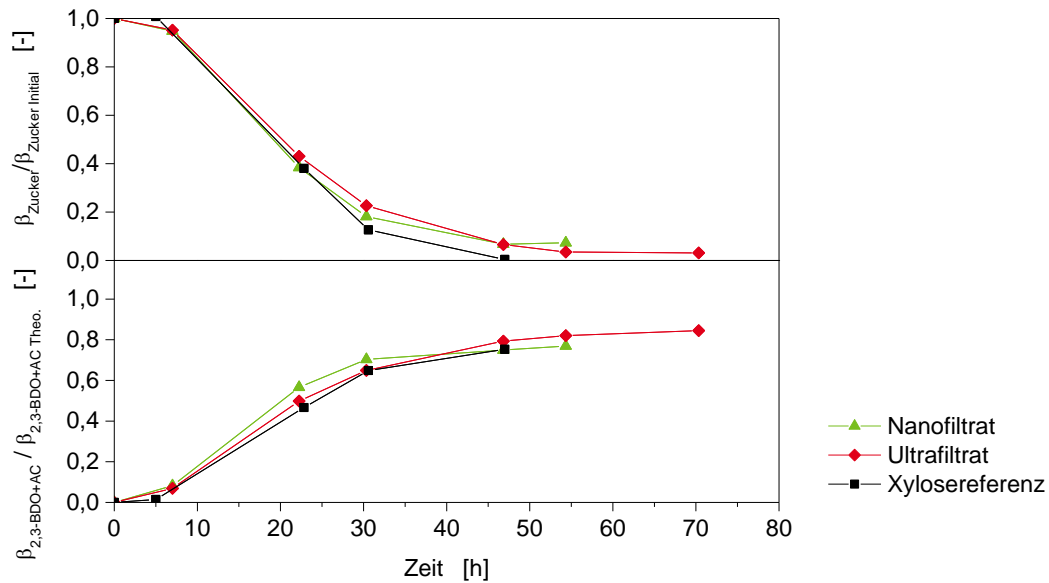


Abbildung 4.80: Normierte Darstellung der Kultivierung von *B. vallismortis* B.14891 mit Xylose (schwarz), detoxifiziertem Ultrafiltrat (rot) und detoxifiziertem Nanofiltrat (grün). Kultivierung im 250 mL Reaktor mit einem Füllvolumen von 100 mL, einer Begasungsrate von 25 sL/h mit Luft, einer Rührerfrequenz von 300 rpm und einer freien Säuerung von pH $6,6 \pm 0,1$ auf 5,8 und anschließender pH-Regelung auf pH 5,8 mit 4 M NaOH.

Die 2,3-BDO-Produktion mit *B. vallismortis* B-14891 mit realem Hemicellulose-Hydrolysat aus Birkenholz war überaus erfolgreich. Bisher gibt es keine vergleichbaren Studien mit reinen Hemicellulose-Hydrolysaten. Soweit bekannt sind die in dieser Arbeit erzielten 2,3-BDO- und Acetoinkonzentrationen somit die höchsten, die bisher mit einem Holz-Hemicellulose-Hydrolysat und einem Risikoklasse-1-Mikroorganismus erreicht wurden. Auf Grundlage dieser Ergebnisse bietet sich die Möglichkeit effiziente Prozesse zur 2,3-BDO-Produktion zu entwickeln, die nicht in Konkurrenz zur Lebensmittel- und Futtermittelindustrie stehen.

5 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurden mit dem Stamm *B. vallismortis* B-14981, soweit bekannt, mehrfach die höchsten 2,3-BDO- und Acetoinkonzentrationen mit einem Risikoklasse-1-Mikroorganismus erzielt:

- 1) Die höchste Produktkonzentration in einem Batch-Ansatz. 220 g/L Glucose wurden zu 101,4 g/L 2,3-BDO und Acetoin umgesetzt.
- 2) Die höchste Produktkonzentration im Fed-Batch-Ansatz mit Xylose. Es wurden 94,7 g/L Produkt gebildet.
- 3) Die höchsten Produktkonzentrationen im Batch-Ansatz mit einem Holz-Hemicellulose-Hydrolysat. Es wurden 29,5 g/L 2,3-BDO und Acetoin mit einer Gesamtausbeute von 0,43 g/g produziert.

Der Stamm *B. vallismortis* B-14981 wurde in einem Screening nach Risikoklasse-1-Mikroorganismen, die Xylose zu 2,3-BDO umsetzen können, selektiert. Im Screening wurden insgesamt 16 Stämme hinsichtlich ihres Substratumsatzes, der Ausbeute, Produktivität und Endtiter von 2,3-BDO und Acetoin mit den Substraten Glucose und Xylose und synthetischen Hydrolysaten charakterisiert.

Neben *B. vallismortis* B-14891 wurden mit den Stämmen *B. atrophaeus* NRS-213 und *B. mojavensis* B-14698 vielversprechende Ergebnisse erzielt. *B. atrophaeus* NRS-213 und *B. mojavensis* B-14698 weisen einen guten Umsatz von Glucose und Xylose zu 2,3-BDO und Acetoin auf. Gegenüber Holz-Hydrolysatnebenprodukten zeigen die Stämme nur eine geringe bis keine Hemmung in der 2,3-BDO- und Acetoinproduktion. Darüber hinaus erwies sich *B. mojavensis* B-14698 als thermophil mit der Fähigkeit, komplexe Substrate zu nutzen.

Der Stamm *B. vallismortis* B-14891 erwies sich in allen Screeningversuchen als effizienter 2,3-BDO-Produzent. Der Stamm kann alle Monosaccharide, die aus Holz-Hydrolysaten gewonnen werden können, mit guten Ausbeuten und Endtitern umsetzen. Des Weiteren stellt der Stamm keine hohen Ansprüche an das Kultivierungsmedium. Der Hefeextraktanteil kann sehr gering sein oder durch Reststoff-Hydrolysate aus der Agrartechnologie substituiert werden. Außerdem ist *B. vallismortis* B-14891 in der Lage, ohne den Zusatz von Komplexbestandteilen zu wachsen und 2,3-BDO und Acetoin zu bilden. Der Zusatz von Ammoniumsulfat und Aminosäuren wirkt sich dabei positiv auf die Produktivität aus.

Die Kultivierungsparameter für *B. vallismortis* B-14891 wurden in dieser Arbeit optimiert. Die pH-Endwertregelung während der freien Säuerung hat einen großen Einfluss auf die Produktverteilung von *B. vallismortis* B-14891. Die geringsten Nebenproduktmengen werden mit Glucose bei einer pH-Endwertregelung von 5,2 gebildet. Mit dem Substrat Xylose liegt die optimale pH-Endwertregelung bei pH 5,8. Bei diesen pH-Werten werden mit dem jeweiligen Substrat die höchsten 2,3-BDO- und Acetoinkonzentrationen gebildet.

Die Sauerstoffverfügbarkeit hat ebenfalls einen Einfluss auf die 2,3-BDO-Produktion und Nebenproduktbildung. Mit dem Substrat Glucose wurden die besten Ergebnisse mit 600 rpm und einer Begasungsrate von 25 sL/h mit Luft erzielt. Mit dem Substrat Xylose führen Rührerdrehzahlen von 300 rpm und einer Belüftung von 25 sL/h mit Luft zu guten 2,3-BDO- und Acetoinkonzentrationen. Auf die Kultivierungen mit Xylose hatte der Sauerstoffeintrag einen geringeren Einfluss als die pH-Endwertregelung.

Im Batch-Ansatz mit 220 g/L Glucose produzierte *B. vallismortis* B-14891 79,2 g/L 2,3-BDO und 22,2 g/L Acetoin. Die Gesamtausbeute lag bei 0,50 g/g und die -produktivität bei 1,26 g/(L·h). Im Fed-Batch-Ansatz wurden maximal 108,9 g/L 2,3-BDO und 20,8 g/L Acetoin produziert. Die Gesamtausbeute lag bei 0,47 g/g und die -produktivität bei 0,91 g/(L·h). Gegenüber dem Batch-Ansatz konnte der Endtiter um 28,3 g/L Produkt erhöht werden.

Mit Xylose als einzige Kohlenstoffquelle wurden 100 g/L Xylose mit einer Gesamtausbeute von 0,38 g/g und einer Produktivität von 1,0 g/(L·h) zu 26,9 g/L 2,3-BDO und 10,6 g/L Acetoin umgesetzt. Im Fed-Batch-Ansatz mit Xylose konnten insgesamt 75,6 g/L 2,3-BDO und 19,1 g/L Acetoin gebildet werden. Die Gesamtausbeute betrug 0,49 g/g.

Im Anschluss an die Kultivierung mit reiner Xylose wurde *B. vallismortis* B-14891 mit realen Birkenholz-Hemicellulose-Hydrolysaten kultiviert. Es wurden Inhibitionstests mit nachgewiesenen Nebenprodukten durchgeführt. Den größten negativen Einfluss auf die Kultivierung übt Acetat aus. Gegenüber den Nebenprodukten Furfural, 5-HMF und Syringaldehyd weist der Stamm eine hohe Resistenz auf.

Für eine Kultivierung mit realen Birkenholz-Hemicellulose-Hydrolysaten muss die Acetatkonzentration reduziert werden. Für die Detoxifizierung eignet sich eine flüssig-flüssig-Extraktion mit MTBE. Durch die Extraktion konnte die Acetatkonzentration im Ultrafiltrat von 19,9 g/L auf 1,9 g/L reduziert werden und im Nanofiltrat von 14,1 g/L auf 5,7 g/L. In beiden Hydrolysatfraktionen lag damit die Acetatkonzentration unterhalb der inhibierenden Konzentration.

Mit dem detoxifizierten Ultrafiltrat wurde der gesamte Zucker umgesetzt und 22,7 g/L 2,3-BDO und 6,8 g/L Acetoin produziert. Die Gesamtproduktivität betrug 0,63 g/(L·h) mit einer Gesamtausbeute von 0,43 g/g. Im Nanofiltrat wurde ebenfalls der gesamte Zucker umgesetzt und 15,3 g/L BDO und 6,2 g/L Acetoin gebildet. Die Gesamtproduktivität lag bei 0,46 g/(L·h) und die Gesamtausbeute bei 0,40 g/g. Die Umsetzung der Hemicellulose aus den Holz-Hydrolysaten erfolgte so gut wie mit reiner Xylose.

6 Ausblick

In dieser Arbeit konnten durch die Optimierung der Kultivierungsparameter für *B. vallismortis* B-14891 bereits hohe Endtiter an 2,3-BDO und Acetoin mit den Reinsubstraten Glucose und Xylose produziert werden. Der maximal erreichte Endtiter mit Glucose lag bei 129,7 g/L Produkt. An dieser Stelle sollte untersucht werden, ob eine Produktinhibition vorliegt. Sollte der Stamm nicht durch den hohen 2,3-BDO- und Acetointiter gehemmt werden, lohnen sich weitere Prozessoptimierungen.

Die effiziente Verwertung von Hemicellulose-Hydrolysat durch *B. vallismortis* B-14891 bietet die Möglichkeit Prozesse zur 2,3-BDO-Produktion zu entwickeln, in denen Rohstoffe eingesetzt werden, die nicht in Konkurrenz zur Lebensmittel- und Futtermittelindustrie stehen. Nur die Acetatkonzentration muss in einem nicht hemmenden Bereich von < 10 g/L liegen, gegen andere Nebenprodukte in Holz-Hydrolysaten ist *B. vallismortis* B-14891 weitestgehend unempfindlich. Die Nutzung von Hemicellulose-Hydrolysat durch *B. vallismortis* B-14891 ist daher sehr interessant. An dieser Stelle sollten weitere Untersuchungen und Optimierungen sowie ein Scale-up erfolgen.

Vielversprechend sind auch Untersuchungen hinsichtlich der Nutzung von weiteren Reststoffen aus der Agrarwirtschaft als Stickstoff- und Kohlenstoffquelle. Nach Koutinas et al. 2016, ist die biotechnische Produktion nur dann wirtschaftlich, wenn die Kosten der Kohlenstoffquelle und die Kosten für eine Zudosierung von Supplinen wie Hefeextrakt oder Aminosäuren reduziert werden kann. Viele Risiko-1-Mikroorganismen sind jedoch sensitiv gegenüber Nebenprodukten aus Rest- oder Rohstoffhydrolysaten und/oder benötigen die Zudosierung von Supplinen für einen effizienten Prozess. Für den Risiko-1-Mikroorganismus *B. vallismortis* B-14891 trifft beides nicht zu. Mit geeigneten Prozessbedingungen und optimierten Medien könnte sich mit *B. vallismortis* B-14891 somit erstmals ein wirtschaftlicher biotechnischer Prozess zur Herstellung von 2,3-BDO realisieren lassen.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 2.1: Stereoisomere von 2,3-BDO (nach Celinska und Grajek 2009 und Ji et al. 2011).....	3
Abbildung 2.2: Stoffwechselwege der gemischten Säuregärung. (1) Enzyme der Glykolyse, (PPP) Pentosephosphatweg, (2) Pyruvat-Kinase, (3) Lactat-Dehydrogenase, (4) Acetolactat-Synthase, (5) Acetolactat-Decarboxylase, (6) Butandiol-Dehydrogenase/Acetoin Reductase, (7) Pyruvat-Formiat-Lyase, (8) Acetaldehyd-Dehydrogenase, (9) Alkohol-Dehydrogenase, (10) Phosphotransacetylase, (11) Acetat-Kinase, (12) Formiat-Hydrogen- Lyase, (13) Enzyme des Citronensäurecyclus (TCA), (14) Phosphoenolpyruvat Carboxylase, (15) Malat-Dehydrogenase, (16) Fumarase, (17) Succinat-Dehydrogenase. Abgeändert nach Bosma et al. 2013 und Converti et al. 2003.	5
Abbildung 2.3: Aktivierung, Induktion und Inhibition der Enzyme des 2,3-BDO-Stoffwechselwegs. (1) Acetolactat-Synthase; (2) Acetolactat-Decarboxylase; (3) Butandiol-Dehydrogenase/Acetoin Reductase. Durchgezogener Pfeil ++: Induktion des Enzyms; fein gestrichelter Pfeil +: Aktivierung des Enzyms; gestrichelter Pfeil -: Inhibition. Abbildung geändert nach Maddox 1996.....	8
Abbildung 2.4: Einfluss der relativen Sauerstoffverfügbarkeit auf die fraktionierte Ausbeute der Produkte der gemischten Säurefermentation (ungefähre Darstellung nach De Mas et al. 1988 und Maddox 1996).....	10
Abbildung 2.5: Schematische Darstellung von Lignocellulose und der Verteilung von Cellulose, Hemicellulose und Lignin. Abbildung geändert nach Kobayashi und Fukuoka 2013.....	14
Abbildung 2.6: Partielle Struktur von O-Acetyl-4-Methylglucuronoxylan (Mamman et al. 2008).....	15
Abbildung 2.7: Reaktionsschema der Hydrolyse von Lignocellulose. Es können Monosaccharide, schwache Säuren, Furanderivate und phenolische Komponenten entstehen (Abbildung geändert nach Palmqvist und Hahn-Hägerdal 2000b).	16
Abbildung 3.1: Schema einzelner Kolonien auf einer Argarplatte.	30
Abbildung 3.2: Prozessschema zur Nutzung von Birkenholz-Hemicellulose als Kohlenstoffquelle für die Kultivierung mit <i>B. vallismortis</i> B-14891. Bis zur gestrichelten Linie wurde das Hydrolysat von der Lappeenranta University of Technology gefertigt und zur Verfügung gestellt. UF: Ultrafiltrat, NF: Nanofiltrat.	33
Abbildung 3.3: Präparation der Anionentauschersäulen.....	35

Abbildung 3.4: Versuchsaufbau der Detoxifizierung mittels Anionentauscher und RP-Phase (rechts).....	36
Abbildung 3.5: Flüssig-Flüssig-Extraktion nach Durchmischung der organischen und wässrigen Phase.....	37
Abbildung 3.6: Flüssig-Flüssig-Extraktion. Phasentrennung nach 15 min Ruhephase.	37
Abbildung 3.7: Schematische Darstellung des online CTR-Verlaufs einer Kultivierung bei der die C-Quelle verbraucht ist (durchgezogene Linie) und einer Kultivierung die zum Erliegen kommt ohne dass die C-Quelle verbraucht ist (gestrichelte Linie).	42
Abbildung 4.1: Glucoseverbrauch und Produktbildung von <i>B. licheniformis</i> DSM 8785 in Basal-, Defined- und MRS-Medium. Kultivierung im Schüttelkolben mit 3 Schikanen mit einem Füllvolumen von 60 mL bei 50 °C und 125 rpm.	55
Abbildung 4.2: Glucoseverbrauch und Produktbildung von <i>B. amyloliquefaciens</i> DSM 7 in Basal-, Defined- und MRS-Medium. Kultivierung im Schüttelkolben mit 3 Schikanen mit einem Füllvolumen von 50 mL bei 37 °C und 100 rpm.	55
Abbildung 4.3: Glucoseverbrauch und Produktbildung von <i>P. polymyxa</i> DSM 356 in Basal-, Defined- und MRS-Medium. Kultivierung in 96-Well MTP mit einem Füllvolumen von 200 µL bei 37,5 °C und 800 rpm.	56
Abbildung 4.4: Kultivierung von <i>B. licheniformis</i> DSM 8785 in Basal (ausgefüllte Zeichen) und Basal-HE-Medium (leere Zeichen). Vergleich des Glucoseverbrauchs (Rechteck), der Produktbildung (Kreis) und der optischen Dichte bei 600 nm (Dreieck). Kultivierung im Schüttelkolben mit 3 Schikanen mit einem Füllvolumen von 60 mL bei 50 °C und 125 rpm.	57
Abbildung 4.5: <i>B. atrophaeus</i> NRS-213: Einfluss unterschiedlicher Temperaturen auf den Substrat-verbrauch (Kreis), die 2,3-BDO- und Acetoin-Ausbeute (Rechteck) und die optische Dichte (Dreieck). Kultivierung in 96-Well Mikrotiterplatten mit 100 g/L Glucose (gefüllte Zeichen) bzw. Xylose (leere Zeichen) bei einer Schüttelfrequenz von 700 rpm.....	62
Abbildung 4.6: <i>B. mojavensis</i> B-14698: Einfluss unterschiedlicher Temperaturen auf den Substrat-verbrauch (Kreis), die 2,3-BDO- und Acetoin-Ausbeute (Rechteck) und die optische Dichte (Dreieck). Kultivierung in 96-Well Mikrotiterplatten mit 100 g/L Glucose (gefüllte Zeichen) bzw. Xylose (leere Zeichen) und einer Schüttelfrequenz von 700 rpm.....	63
Abbildung 4.7: <i>B. subtilis</i> B-571: Einfluss unterschiedlicher Temperaturen auf den Substratverbrauch (Kreis), die 2,3-BDO- und Acetoin-Ausbeute (Rechteck) und die optische Dichte (Dreieck). Kultivierung in 96-Well Mikrotiterplatten mit 100 g/L Glucose (gefüllte Zeichen) bzw. Xylose (leere Zeichen) und einer Schüttelfrequenz von 700 rpm.....	64

Abbildung 4.8: <i>B. subtilis inaquosorum</i> B-23056: Einfluss unterschiedlicher Temperaturen auf den Substratverbrauch (Kreis), die 2,3-BDO- und Acetoin-Ausbeute (Rechteck) und die optische Dichte (Dreieck). Kultivierung in 96-Well Mikrotiterplatten mit 100 g/L Glucose (gefüllte Zeichen) bzw. Xylose (leere Zeichen) und einer Schüttelfrequenz von 700 rpm.....	65
Abbildung 4.9: <i>B. vallismortis</i> B-14891: Einfluss unterschiedlicher Temperaturen auf den Substratumsatz (Kreis), die 2,3-BDO und Acetoin Ausbeute (Rechteck) und die optische Dichte (Dreieck). Kultivierung in 96-Well Mikrotiterplatten mit 100 g/L Glucose (gefüllte Zeichen) bzw. Xylose (leere Zeichen) und einer Schüttelfrequenz von 700 rpm.....	65
Abbildung 4.10: Glucoseverbrauch (oben) und 2,3-BDO-Bildung (unten) mit den Eigenisolaten GB 1, LB 10, B 1-7 und GK 16 und dem Referenzstamm <i>B. licheniformis</i> DSM 8785 bei einer Kultivierungs-temperatur von 50 °C und einer Schüttelfrequenz von 125 rpm im 300 mL Schüttelkolben.	69
Abbildung 4.11: Kultivierung von <i>B. licheniformis</i> DSM 8785 mit verschiedenen Puffern. Kultivierung bei 50 °C mit CaCO ₃ , Phosphatpuffer und ungepuffert im 300 mL Schüttelkolben bei 125 rpm und mit MES in der 96-Well MTP bei 700 rpm.	71
Abbildung 4.12: Glucoseverbrauch und Produktbildung von 16 Stämmen in Basal-HE-Medium mit 100 g/L Glucose. Kultivierung in 96-Well MTP bei 39 °C und 700 rpm für 30 h.....	72
Abbildung 4.13: Xyloseverbrauch und Produktbildung von 16 Stämmen in Basal-HE-Medium mit 100 g/L Xylose und 0,3 M MES. Kultivierung in 96-Well MTP bei 39 °C, 700 rpm für 30 h.....	73
Abbildung 4.14: Glucoseverbrauch und 2,3-BDO- + Acetoinproduktion von 16 Stämmen in Basal-HE-Medium mit 100 g/L Glucose und Hydrolysatnebenprodukten. Kultivierung in 96-Well MTP bei 39 °C, 700 rpm für 30 h.	75
Abbildung 4.15: Xyloseverbrauch und 2,3-BDO- + Acetoinproduktion von 16 Stämmen in Basal-HE-Medium mit 100 g/L Xylose, 0,3 M MES und Hydrolysatnebenprodukten. Kultivierung in 96-Well MTP bei 39 °C, 700 rpm für 30 h.	77
Abbildung 4.16: 2,3-BDO- und Acetoinproduktion mit dem Referenzstamm <i>B. licheniformis</i> DSM 8785 mit 16 verschiedenen Substraten als einzige Kohlenstoffquelle. Kultivierung in 96-Well MTP mit 56,7 ± 4,1 g/L Substrat bei 39 °C und 700 rpm für 16 - 47 h (vergl. Tabelle A 1). Durchführung im Doppelansatz.	79
Abbildung 4.17: 2,3-BDO- und Acetoinproduktion mit <i>B. mojavensis</i> B-14698 mit 16 verschiedenen Substraten als einzige Kohlenstoffquelle. Kultivierung in 96-Well MTP mit 56,7 ± 4,1 g/L Substrat bei 39 °C und 700 rpm für 16 - 47 h (vergl. Tabelle A 2). Durchführung im Doppelansatz.	80

Abbildung 4.18: 2,3-BDO- und Acetoinproduktion mit <i>B. atrophaeus</i> NRS-213 mit 16 verschiedenen Substraten als einzige Kohlenstoffquelle. Kultivierung in 96-Well MTP mit $56,7 \pm 4,1$ g/L Substrat bei 39 °C und 700 rpm für 16 - 47 h (vergl. Tabelle A 3). Durchführung im Doppelansatz.	81
Abbildung 4.19: 2,3-BDO- und Acetoinproduktion mit <i>B. vallismortis</i> B-14891 mit 16 verschiedenen Substraten als einzige Kohlenstoffquelle. Kultivierung in 96-Well MTP mit $56,7 \pm 4,1$ g/L Substrat bei 39 °C und 700 rpm für 16 - 47 h (vergl. Tabelle A 4). Durchführung im Doppelansatz.	81
Abbildung 4.20: Maximale Produktbildung unter Verwendung von Maisxylan und Haferspelzenxylan als Substrat mit den Stämmen <i>B. licheniformis</i> DSM 8785, <i>B. atrophaeus</i> NRS-213, <i>B. mojavensis</i> B-14698 und <i>B. vallismortis</i> B-14891. Kultivierung in 96-Well MTP bei 39 °C und 700 rpm für max. 48 h mit ca. 50 g/L Xylan. Durchführung im Doppelansatz.	83
Abbildung 4.21: Maximale Produktbildung unter Verwendung von Maisxylan, Haferspelzenxylan und Buchenxylan im SSF-Prozess mit Biogazyme 2x mit den Stämmen <i>B. licheniformis</i> DSM 8785, <i>B. atrophaeus</i> NRS-213, <i>B. mojavensis</i> B-14698 und <i>B. vallismortis</i> B-14891. Kultivierung in 96-Well MTP bei 39 °C für die Stämme <i>B. atrophaeus</i> NRS-213 und <i>B. vallismortis</i> B-14891 und 41 °C für <i>B. licheniformis</i> DSM 8785 und <i>B. mojavensis</i> B-14698 bei 700 rpm für max. 70 h. Durchführung im Doppelansatz.	84
Abbildung 4.22: HPLC-Chromatogramm zur Veranschaulichung des Maisxylan-Abbaus durch Biogazyme 2x in der 96-Well MTP bei 39 °C und 700 rpm. Die Pfeile zeigen 1: Polysaccharidfraktion, 2: Oligosaccharidfraktion, 3: Xylose.	85
Abbildung 4.23: HPLC-Chromatogramm zur Veranschaulichung des Haferspelzenxylan-Abbaus durch Biogazyme 2x in der 96-Well MTP bei 39 °C und 700 rpm. Die Pfeile zeigen 1: Polysaccharidfraktion, 2: Oligosaccharidfraktion, 3: Xylose.	86
Abbildung 4.24: HPLC-Chromatogramm zur Veranschaulichung des Buchenxylan-Abbaus durch Biogazyme 2x in der 96-Well MTP bei 39 °C und 700 rpm. Die Pfeile zeigen 1: Polysaccharidfraktion, 2: Oligosaccharidfraktion, 3: Xylose.	86
Abbildung 4.25: Xylosekonzentration nach 70 h Inkubation von jeweils 50 g/L Maisxylan, Hafer-spelzenxylan und Buchenxylan mit Biogazyme 2x in 96-Well MTP bei 39 °C bzw. 41 °C und 700 rpm.	87
Abbildung 4.26: Produktbildung in Abhängigkeit der Hefeextraktkonzentration mit den Stämmen <i>B. licheniformis</i> DSM 8785, <i>B. atrophaeus</i> NRS-213, <i>B. mojavensis</i> B-14698 und <i>B. vallismortis</i> B-14891. Kultivierung in 96-Well MTP bei 39 °C und 700 rpm für 30 h und einer Glucosestart-konzentration von 100 g/L.	89
Abbildung 4.27: Optische Dichte bei 595 nm im Kultivierungsverlauf von <i>B. licheniformis</i> DSM 8785, <i>B. atrophaeus</i> NRS-213, <i>B. mojavensis</i> B-14698 und <i>B. vallismortis</i> B-14891	

in Abhängigkeit der Hefeextraktkonzentration. Kultivierung in 96-Well MTP bei 39 °C und 700 rpm für 30 h und einer Glucosestartkonzentration von 100 g/L.....	89
Abbildung 4.28: Vergleich der Produktendkonzentration (2,3-BDO und Acetoin) im Basal-HE-Medium und im angepassten Medium mit den Stämmen <i>B. atrophaeus</i> NRS-213, <i>B. mojavensis</i> B-14698 und <i>B. vallismortis</i> B-14891. Kultivierung in 96-Well MTP bei 39 °C und 700 rpm für 30 h. Die Glucose-startkonzentration betrug 100 g/L. .	91
Abbildung 4.29: 2,3-BDO- + Acetoinkonzentration in Abhängigkeit der MgSO_4 - und $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Konzentration im Basal-HE-Medium mit dem Stamm <i>B. mojavensis</i> B-14698. Kultivierung in 96-Well MTP bei 39 °C und 700 rpm für 30 h. Die Glucosekonzentration betrug 100 g/L.....	92
Abbildung 4.30: Prozentuale Produktausbeute (2,3-BDO + Acetoin) in Abhängigkeit der MgSO_4 - und $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Konzentration im Basal-HE-Medium mit dem Stamm <i>B. mojavensis</i> B-14698. Kultivierung in 96-Well MTP bei 39 °C und 700 rpm für 30 h. Die Glucosekonzentration betrug 100 g/L.....	92
Abbildung 4.31: 2,3-BDO- und Acetoinkonzentration in Abhängigkeit der initialen Glucosekonzentration für den Stamm <i>B. atrophaeus</i> NRS-213. Kultivierung in einer 96-Well MTP bei 39 °C und 700 rpm.	95
Abbildung 4.32: 2,3-BDO- und Acetoinkonzentration in Abhängigkeit der initialen Glucosekonzentration für den Stamm <i>B. mojavensis</i> B-14698. Kultivierung in einer 96-Well MTP bei 39 °C und 700 rpm in modifiziertem Basal-HE-Medium für <i>B. mojavensis</i> B-14698.....	96
Abbildung 4.33: 2,3-BDO- und Acetoinkonzentration in Abhängigkeit der initialen Glucosekonzentration für den Stamm <i>B. vallismortis</i> B-14891. Kultivierung in einer 96-Well MTP bei 39 °C und 700 rpm.....	97
Abbildung 4.34: Produktbildung und Glucoseverbrauch von <i>B. vallismortis</i> B-14891 im Basal-HE-Medium mit ca. 50 g/L Glucose. Kultivierung in 96-Well MTP bei 39 °C und 700 rpm. Mittelwerte aus zwei Kultivierungen.	100
Abbildung 4.35: Aminosäureverbrauch von <i>B. vallismortis</i> B-14891 im Basal-HE-Medium und 50 g/L Glucose. Kultivierung in 24-Well MTP bei 39 °C und 320 rpm. Mittelwerte aus zwei Kultivierungen.....	100
Abbildung 4.36: Kultivierung mit 200 g/L Glucose mit <i>B. vallismortis</i> B-14891. Kultivierung im 250 mL Reaktor mit einem Füllvolumen von 100 mL, einer Begasungsrate von 25 sL/h mit Luft, einer Rührerfrequenz von 600 rpm, einer freien Säuerung von 6,6 auf pH 5,0 und einer anschließenden pH-Endwertregelung bei pH 5,0 mit 2 M NaOH. Daten aus zwei Kultivierungen.....	101
Abbildung 4.37: Kationenverbrauch von <i>B. vallismortis</i> B-14891. Kultivierung im 250 mL Reaktor mit 200 g/L Glucose, einem Füllvolumen von 100 mL, einer Begasungsrate von 25 sL/h mit Luft, einer Rührerfrequenz von 600 rpm, einer freien Säuerung	

von 6,6 auf pH 5,0 und einer anschließenden pH-Endwertregelung bei pH 5,0 mit 2 M NaOH. Daten aus zwei Kultivierungen.	102
Abbildung 4.38: Anionenverbrauch von <i>B. vallismortis</i> B-14891. Kultivierung im 250 mL Reaktor mit 200 g/L Glucose, einem Füllvolumen von 100 mL, einer Begasungsrate von 25 sL/h mit Luft, einer Rührerfrequenz von 600 rpm, einer freien Säuerung von 6,6 auf pH 5,0 und einer anschließenden pH-Endwertregelung bei pH 5,0 mit 2 M NaOH. Daten aus zwei Kultivierungen.	102
Abbildung 4.39: Produktbildung von <i>B. vallismortis</i> B-14891 mit verschiedenen organischen und anorganischen Stickstoffquellen ohne Hefeextraktzusatz. Kultivierung in einer 24-Well MTP mit einem Füllvolumen von 1 mL bei 37 °C, 320 rpm und einer initialen Glucosekonzentration von 50 g/L. Das Medium wurde mit 0,1 M MES bei einem Start-pH-Wert von $6,6 \pm 0,1$ gepuffert. Kultivierung im Doppelansatz.....	103
Abbildung 4.40: Produktbildung von <i>B. vallismortis</i> B-14891 mit verschiedenen organischen und anorganischen Stickstoffquellen und 1 g/L Hefeextrakt. Kultivierung in einer 24-Well MTP mit einem Füllvolumen von 1 mL bei 37 °C, 320 rpm und einer initialen Glucosekonzentration von 50 g/L. Das Medium wurde mit 0,1 M MES bei einem Start-pH-Wert von $6,6 \pm 0,1$ gepuffert. Kultivierung im Doppelansatz.....	105
Abbildung 4.41: Produktbildung von <i>B. vallismortis</i> B-14891 ohne Hefeextrakt, mit Zusatz von Ammoniumsulfat, Aminosäuren (AS) und Vitaminen (Vit). Kultivierung in einer 24-Well MTP mit einem Füllvolumen von 1 mL bei 37 °C, 320 rpm und einer initialen Glucosekonzentration von 50 g/L. Das Medium wurde mit 0,1 M MES bei einem Start-pH-Wert von $6,6 \pm 0,1$ gepuffert. Kultivierung im Doppelansatz.....	106
Abbildung 4.42: Produktbildung von <i>B. vallismortis</i> B-14891 mit Zusatz von Ammoniumsulfat, Aminosäuren (AS), Vitaminen (Vit) und 1 g/L Hefeextrakt. Kultivierung in einer 24-Well MTP mit einem Füllvolumen von 1 mL bei 37 °C, 320 rpm und einer initialen Glucosekonzentration von 50 g/L. Das Medium wurde mit 0,1 M MES bei einem Start-pH-Wert von $6,6 \pm 0,1$ gepuffert. Kultivierung im Doppelansatz.....	107
Abbildung 4.43: Produktbildung von <i>B. vallismortis</i> B-14891 mit Zusatz von hydrolysiertem Rapsschrot und Proti Grain® sowie mit reduziertem Rapsschrot und Proti Grain® mit Vitamin- (Vit) und Aminosäurezusatz (AS). Kultivierung in einer 24-Well MTP mit einem Füllvolumen von 1 mL bei 37 °C, 320 rpm und einer initialen Glucosekonzentration von 50 g/L. Kultivierung im Doppelansatz.	108
Abbildung 4.44: Nebenproduktspektrum von <i>B. vallismortis</i> B-14891 in Abhängigkeit der pH-Endwertregelung bei der Kultivierung mit Glucose. Kultivierung im 250 mL Reaktor mit einem Füllvolumen von 100 mL, einer Begasungsrate von 25 sL/h mit Luft, einer Rührerfrequenz von 600 rpm und einem Start-pH-Wert von $6,6 \pm 0,1$. Die pH-Regelung setzte bei Erreichen eines bestimmten pH-Wertes ein, wobei durch 2 M NaOH ein weiteres Absinken des pH-Wertes verhindert wurde. Die Probenahme erfolgte jeweils nach Eintritt der Glucoselimitierung. Die Summe der	

Nebenprodukte fasst die Bildung von Acetat, Succinat, Glycerin, Ethanol und Lactat zusammen.....	112
Abbildung 4.45: 2,3-BDO- und Acetoinkonzentration bei Eintritt in die Glucoselimitierung. Kultivierung von <i>B. vallismortis</i> B-14891 im 250 mL Reaktor mit einem Füllvolumen von 100 mL, einer Begasungsrate von 25 sL/h, einem Sauerstoffgehalt von 5 – 30 %, einer Rührerfrequenz von 500 – 800 rpm, einem Start-pH-Wert von $6,6 \pm 0,1$ und einer freien Säuerung bis pH 5,0. Die Initiale Glucosekonzentration betrug 100 g/L.	113
Abbildung 4.46: Dauer bis zur Glucoselimitierung (t_{Lim} (Glucose)) in Abhängigkeit des Sauerstoff-gehaltes und der Rührerdrehzahl. Kultivierung von <i>B. vallismortis</i> B-14891 im 250 mL Reaktor mit einem Füllvolumen von 100 mL, einer Begasungsrate von 25 sL/h, einem Sauerstoffgehalt von 5 – 30 %, einer Rührerfrequenz von 500 – 800 rpm und einem Start-pH-Wert von $6,6 \pm 0,1$. Die initiale Glucosekonzentration betrug 100 g/L. In den roten Bereichen konnte die Glucose innerhalb von 48 h nicht vollständig verstoffwechselt werden.	114
Abbildung 4.47: Summe der gebildeten Nebenprodukte (Acetat, Ethanol, Lactat und Succinat) von <i>B. vallismortis</i> B-14891 nach 21,5 h Kultivierung in Abhängigkeit der Rührerdrehzahl und des Sauerstoffgehalts der Zuluft. Kultivierung im 250 mL Reaktor mit einem Füllvolumen von 100 mL, einer Begasungsrate von 25 sL/h, einem Sauerstoffgehalt von 5 – 30 %, einer Rührerfrequenz von 500 – 800 rpm und einem Start-pH-Wert von $6,6 \pm 0,1$. Die initiale Glucosekonzentration betrug 100 g/L.	115
Abbildung 4.48: Kultivierung von <i>B. vallismortis</i> B-14891 im 250 mL DASbox® Reaktorsystem mit Basal-HE-Medium mit 200 g/L Glucose, einem Füllvolumen von 100 mL, einer Begasung von 25 sL/h, bei 37 °C und 600 rpm. Freie Säuerung von pH $6,6 \pm 0,1$ auf pH 5,0 und anschließender pH-Regelung mit 2 M NaOH auf \geq pH 5. Mittelwerte und Standardabweichungen resultieren aus 3 Kultivierungen.	117
Abbildung 4.49: Kultivierung von <i>B. vallismortis</i> B-14891 im 250 mL DASbox® Reaktorsystem mit Basal-HE-Medium mit 200 g/L Glucose, einem Füllvolumen von 100 mL, einer Begasung von 25 sL/h, bei 37 °C und 700 rpm. Freie Säuerung von pH $6,6 \pm 0,1$ auf pH 5,0 und anschließender pH-Regelung mit 2 M NaOH auf \geq pH 5. Mittelwerte und Standardabweichungen resultieren aus 2 Kultivierungen.	117
Abbildung 4.50: Kultivierung von <i>B. vallismortis</i> B-14891 mit zweistufiger Rührerfrequenz. Kultivierung mit Basal-HE-Medium mit 200 g/L Glucose im 250 mL Reaktor mit einem Füllvolumen von 100 mL, einer Begasungsrate von 25 sL/h mit Luft, einer Rührerfrequenz von 700 rpm für 6,5 h danach 600 rpm bei 37 °C und einem Start-pH-Wert von $6,6 \pm 0,1$ und einer End-pH-Wertregelung bei pH 5,0 mit 2 M NaOH.	118

- Abbildung 4.51: Referenzkultivierung mit 100 g/L Glucose mit *B. vallismortis* B-14891. Kultivierung im 250 mL Reaktor mit einem Füllvolumen von 100 mL, einer Begasungsrate von 25 sL/h mit Luft, einer Rührerfrequenz von 600 rpm und einem Start-pH-Wert von $6,6 \pm 0,1$ und einer End-pH-Wertregelung bei pH 5,0 mit 2 M NaOH..... 119
- Abbildung 4.53: Online CTR, RQ, Gelöstsauerstoff und pH-Wert der Referenzkultivierung mit 100 g/L Glucose mit *B. vallismortis* B-14891. 1) Sauerstofflimitierung, 2) Wechsel von exponentieller in die stationäre Phase, 3) Glucoselimitierung. Kultivierung im 250 mL Reaktor mit einem Füllvolumen von 100 mL, einer Begasungsrate von 25 sL/h mit Luft, einer Rührerfrequenz von 600 rpm, einer freien Säuerung von pH $6,6 \pm 0,1$ und anschließender pH-Endwertregelung bei pH 5,0 mit 2 M NaOH. ... 120
- Abbildung 4.54: 2,3-BDO- und Acetoinkonzentration sowie der Substratumsatz (X) in Abhängigkeit der initialen Glucosekonzentration (β_{Initial}) für den Stamm *B. vallismortis* B-14891. Kultivierungen bis 180 g/L Glucose erfolgten in einer 96-Well MTP bei 39 °C und 700 rpm. Kultivierungen ab 200 g/L Glucose wurden im 250 mL DASbox-Reaktorsystem durchgeführt. Das Füllvolumen betrug 100 mL, die Rührerdrehzahl 600 rpm, die Temperatur 37 °C und die Begasung betrug 25 sL/h mit Luft. Es fand eine freie Säuerung von pH $6,6 \pm 0,1$ auf pH 5,0 mit anschließender pH-Regelung mit 2 M NaOH auf pH 5,0 statt. 121
- Abbildung 4.55: Fed-Batch-Kultivierung mit *B. vallismortis* B-14891 mit Glucose und Hefeextrakt. Kultivierung im 250 mL Reaktor mit einem Füllvolumen von 100 mL, einer Begasungsrate von 25 sL/h mit Luft und einer Rührerfrequenz von 600 rpm. Es fand eine freie Säuerung von pH $6,6 \pm 0,1$ auf pH 5,0 mit anschließender pH-Regelung mit 2 M NaOH auf pH 5,0 statt. Feed (markiert durch Pfeile) 1 und 3: 50 g/L Glucose und Feed 2 und 4: 50 g/L Glucose + 10 g/L Hefeextrakt. 123
- Abbildung 4.56: Online CTR im Fed-Batch-Ansatz mit *B. vallismortis* B-14891 mit Glucose und Hefeextrakt. Feed im Wechsel: 50 g/L Glucose und 50 g/L Glucose + 10 g/L Hefeextrakt. 124
- Abbildung 4.57: Fed-Batch-Kultivierung mit *B. vallismortis* B-14891 mit Glucose. Kultivierung im 250 mL Reaktor mit einem Füllvolumen von 100 mL, einer Begasungsrate von 25 sL/h mit Luft und einer Rührerfrequenz von 600 rpm. Es fand eine freie Säuerung von pH $6,6 \pm 0,1$ auf pH 5,0 mit anschließender pH-Regelung mit 2 M NaOH auf pH 5,0 statt. Feed 1 + 2 (markiert durch Pfeile): 100 g/L Glucose + 10 g/L Hefeextrakt. 125
- Abbildung 4.58: Online CTR im Fed-Batch-Ansatz mit *B. vallismortis* B-14891 mit Glucose. Feed 1 + 2 (markiert durch Pfeile): 100 g/L Glucose + 10 g/L Hefeextrakt. 126
- Abbildung 4.59: Fed-Batch-Kultivierung mit *B. vallismortis* B-14891 mit Glucose. Kultivierung im 250 mL Reaktor mit einem Füllvolumen von 100 mL, einer Begasungsrate von 25 sL/h mit Luft und einer Rührerfrequenz von 600 rpm. Es fand eine freie Säuerung von pH $6,6 \pm 0,1$ auf pH 5,0 mit anschließender pH-Regelung mit 2 M

NaOH auf pH 5,0 statt. Feed 1 + 2 (markiert durch Pfeile): 100 g/L Glucose + 1 g/L Hefeextrakt.	126
Abbildung 4.60: Online CTR im Fed-Batch-Ansatz mit <i>B. vallismortis</i> B-14891 mit Glucose. Feed 1 + 2 (markiert durch Pfeile): 100 g/L Glucose + 1 g/L Hefeextrakt.	127
Abbildung 4.61: Fed-Batch-Kultivierung mit <i>B. vallismortis</i> B-14891 mit Glucose. Kultivierung im 250 mL Reaktor mit einem Füllvolumen von 100 mL, einer Begasungsrate von 25 sL/h mit Luft, einer Rührerfrequenz von 600 rpm und einer freien Säuerung von pH 6,6 ± 0,1 auf pH 5 und einer anschließenden pH-Regelung auf pH 5,0 in der Referenzkultivierung (volle Symbole). In der Vergleichskultivierung wurde der pH-Wert bei Zugabe des Feeds auf pH 6,5 erhöht, anschließend fand eine pH-Regelung ab pH 5,0 statt (leere Symbole). Feed: 100 g/L Glucose + 1 g/L Hefeextrakt.	128
Abbildung 4.62: pH-Verlauf der Referenz-Fed-Batch-Kultivierung (schwarz) und der Fed-Batch-Kultivierung mit pH-Shift zum Feed (rot). Kultivierung im 250 mL Reaktor mit einem Füllvolumen von 100 mL, einer Begasungsrate von 25 sL/h mit Luft, einer Rührerfrequenz von 600 rpm einer freien Säuerung von pH 6,6 ± 0,1 auf pH 5,0 und einer anschließenden pH-Regelung auf pH 5,0 in der Referenzkultivierung (volle Symbole). In der Vergleichskultivierung wurde der pH-Wert bei Zugabe des Feed auf pH 6,5 erhöht, anschließend fand eine pH-Regelung ab pH 5,0 statt Feed: 100 g/L Glucose + 1 g/L Hefeextrakt.	129
Abbildung 4.63: Fed-Batch-Kultivierung mit <i>B. vallismortis</i> B-14891 mit Glucose. Kultivierung im 250 mL Reaktor mit einem Füllvolumen von 100 mL, einer Begasungsrate von 25 sL/h mit Luft, einer Rührerfrequenz von 600 rpm und einer freien Säuerung von pH 6,6 ± 0,1 auf pH 5,0 und einer anschließenden pH-Regelung auf pH 5,0 mit 2 M NaOH. Feed: 160 g/L Glucose, 1 g/L Hefeextrakt sowie Medienbestandteile der Lösung 2, 3, 4 und 6.	130
Abbildung 4.64: Xyloseverwertung, 2,3-Butandiol- und Acetoinbildung in Abhängigkeit der pH-Endwertregelung mit <i>B. vallismortis</i> B-14891. Kultivierung im 250 mL Reaktor mit einem Füllvolumen von 100 mL, einer Begasungsrate von 25 sL/h mit Luft, einer Rührerfrequenz von 400 rpm und einem Start-pH-Wert von 6,6 ± 0,1.	131
Abbildung 4.65: Nebenproduktspektrum von <i>B. vallismortis</i> B-14891 in Abhängigkeit der pH-Endwertregelung bei der Kultivierung mit Xylose. Kultivierung im 250 mL Reaktor mit einem Füllvolumen von 100 mL, einer Begasungsrate von 25 sL/h mit Luft, einer Rührerfrequenz von 400 rpm und einem Start-pH-Wert von 6,6 ± 0,1. Die Probenahme erfolgte jeweils nach Eintritt der Xyloselimitierung bzw. nach 48 h. Die Summe der Nebenprodukte fasst die Bildung von Acetat, Succinat, Glycerin, Ethanol und Lactat zusammen.	132
Abbildung 4.66: Xyloseverwertung und Produktbildung (2,3-BDO und Acetoin) in Abhängigkeit der Rührerdrehzahl. Kultivierung von <i>B. vallismortis</i> B-14891 im	

DASbox®-Reaktorsystem mit 100 g/L Xylose. 250 mL Reaktorvolumen, Rührerdrehzahl 100 – 600 rpm, 100 mL Füllvolumen, Temperatur 37 °C, Begasung 25 sL/h, Sauerstoffgehalt 21 %. Freie Säuerung von pH 6,6 ± 0,1 auf pH 5,8 mit anschließender pH-Regelung mit 4 M NaOH auf pH 5,8.....	134
Abbildung 4.67: Substratverbrauch und Produktbildung von <i>B. vallismortis</i> B-14891 mit variierender initialer Xylosekonzentration. Kultivierung im DASbox®-Reaktorsystem bei 37 °C, einer Rührergeschwindigkeit von 300 rpm, einer Begasung von 25 sL/h mit Luft und einer freien Säuerung von pH 6,6 ± 0,1 auf pH 5,8 mit anschließender pH-Regelung auf pH 5,8 mit 4 M NaOH.....	135
Abbildung 4.68: Referenzkultivierung mit 100 g/L Xylose mit <i>B. vallismortis</i> B-14891. Kultivierung im 250 mL Reaktor mit einem Füllvolumen von 100 mL, einer Begasungsrate von 25 sL/h mit Luft, einer Rührerfrequenz von 300 rpm und einer freien Säuerung von pH 6,6 ± 0,1 auf pH 5,8 mit anschließender pH-Regelung auf 5,8 mit 4 M NaOH. Darstellung des Mittelwertes von zwei Kultivierungen.	136
Abbildung 4.69: Fed-Batch-Kultivierung mit <i>B. vallismortis</i> B-14891 mit Xylose. Kultivierung im 250 mL Reaktor mit einem Füllvolumen von 100 mL, einer Begasungsrate von 25 sL/h mit Luft, einer Rührerfrequenz von 300 rpm und einer freien Säuerung von pH 6,6 ± 0,1 auf pH 5,8 mit anschließender pH-Regelung auf 5,8 mit 4 M NaOH.	137
Abbildung 4.70: Einfluss der Acetatkonzentration im Basal-HE-Medium auf die Produktbildung (2,3-BDO und Acetoin) von <i>B. vallismortis</i> B-14891. Kultivierung in 96-Well MTP bei 37 °C, 700 rpm, einem Füllvolumen von 200 µL mit 50 g/L Xylose. Mittelwerte aus zwei Kultivierungen.....	141
Abbildung 4.71: Einfluss der Furfuralkonzentration im Basal-HE-Medium auf die Produktbildung (2,3-BDO und Acetoin) von <i>B. vallismortis</i> B-14891. Kultivierung in 96-Well MTP bei 37 °C, 700 rpm, einem Füllvolumen von 200 µL mit 50 g/L Xylose.	142
Abbildung 4.72: Einfluss der 5-HMF-Konzentration im Basal-HE-Medium auf die Produktbildung (2,3-BDO und Acetoin) von <i>B. vallismortis</i> B-14891. Kultivierung in 96-Well MTP bei 37 °C, 700 rpm, einem Füllvolumen von 200 µL mit 50 g/L Xylose.	143
Abbildung 4.73: Einfluss der Syringaldehydkonzentration im Basal-HE-Medium auf die Produktbildung (2,3-BDO und Acetoin) von <i>B. vallismortis</i> B-14891. Kultivierung in 96-Well MTP bei 37 °C, 700 rpm, einem Füllvolumen von 200 µL mit 50 g/L Xylose.	143
Abbildung 4.74: Einfluss der Zinkkonzentration im Basal-HE-Medium auf die Produktbildung (2,3-BDO und Acetoin) von <i>B. vallismortis</i> B-14891. Kultivierung in 96-Well MTP bei 37 °C, 700 rpm, einem Füllvolumen von 200 µL mit 50 g/L Xylose.....	145

Abbildung 4.75: 2,3-BDO-Produktion von <i>B. vallismortis</i> B-14891 in synthetischem und realem Ultra- und Nanofiltrat. Kultivierung in 24-Well MTP mit einem Füllvolumen von 1 mL, bei 37 °C und 320 rpm. Der Start-pH-Wert betrug $6,6 \pm 0,1$. Mittelwerte von zwei Kultivierungen.	146
Abbildung 4.76: Normierte Wiederfindungsrate von Xylose und Acetat der zusammenaddierten Anionentauscherproben mit den jeweiligen Waschfraktionen.	147
Abbildung 4.77: Färbung der UF-Proben (von links nach rechts: Referenz, Dowex 66, Amberlite IRA-96, Amberlyst A21 Lewatit VP OC 1065 und RP-Phase) nach Anwendung der Anionentauscher bzw. der RP-Phase.	148
Abbildung 4.78: Acetat-, Glucose- und Xylosekonzentrationen nach einer flüssig-flüssig-Extraktion mit verschiedenen organischen Lösungsmitteln.	149
Abbildung 4.79: Normierte Acetat-, Glucose- und Xyloseausbeuten nach einer flüssig-flüssig-Extraktion mit UF-Hydrolysat und MTBE, n- und i-Octanol als organische Phase.	150
Abbildung 4.80: Kultivierung von <i>B. vallismortis</i> B-14891 mit acetatreduziertem Ultra- (rot) und Nanofiltrat (grün) als Substrat sowie mit reiner Xylose als Substrat (schwarz). Kultivierung im 250 mL Reaktor mit einem Füllvolumen von 100 mL, einer Begasungsrate von 25 sL/h mit Luft, einer Rührerfrequenz von 300 rpm und einer freien Säuerung von pH $6,6 \pm 0,1$ auf 5,8 und anschließender pH-Regelung auf pH 5,8 mit 4 M NaOH.	151
Abbildung 4.81: Normierte Darstellung der Kultivierung von <i>B. vallismortis</i> B.14891 mit Xylose (schwarz), detoxifiziertem Ultrafiltrat (rot) und detoxifiziertem Nanofiltrat (grün). Kultivierung im 250 mL Reaktor mit einem Füllvolumen von 100 mL, einer Begasungsrate von 25 sL/h mit Luft, einer Rührerfrequenz von 300 rpm und einer freien Säuerung von pH $6,6 \pm 0,1$ auf 5,8 und anschließender pH-Regelung auf pH 5,8 mit 4 M NaOH.	152
Abbildung A 1: Stammidendifikation der DSMZ für das Eigenisolat GB 1.	182
Abbildung A 2: Stammidendifikation der DSMZ für das Eigenisolat LB 10.	183
Abbildung A 3: Stammidendifikation der DSMZ für das Eigenisolat B1-7.	184
Abbildung A 4: Stammidendifikation der DSMZ für das Eigenisolat GK16.	185
Abbildung A 5: Xylose- und Acetatkonzentrationen in den Anionentauscher- und RP-Phasenproben und in den jeweiligen Waschfraktionen (Wash) 1 und 2.	192

Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1: Maximale initiale Substratkonzentration verschiedener Mikroorganismen.	13
Tabelle 3.1: Liste der Bakterienstämme, die auf eine 2,3-BDO-Produktion getestet wurden.	20
Tabelle 3.2: Nutrient-Medium nach Vorgaben der DSMZ (Medium 1)	21
Tabelle 3.3: Zusammensetzung des Defined-Mediums nach Perego et al. 2003.....	21
Tabelle 3.4: Zusammensetzung des MRS-Mediums nach Li et al. 2013b.....	22
Tabelle 3.5: Zusammensetzung MS-Medium nach Xiao et al. 2012.....	22
Tabelle 3.6: Spurenelementlösung für das MS-Medium nach Xiao et al. 2012.....	22
Tabelle 3.7: <i>Bacillus thermoglucosidasius</i> Medium nach Vorgaben der DSMZ (Medium 305)	23
Tabelle 3.8: Zusammensetzung des Basal-Mediums nach Nakashimada et al. 1998.....	23
Tabelle 3.9: Zusammensetzung der Spurenelementlösung für das Basal-Medium.	24
Tabelle 3.10: Zusätze für das synthetische Holz-Hydrolysat abgeleitet nach Jurchescu 2014.	25
Tabelle 3.11: Synthetisches Ultra- und Nanofiltrat.....	25
Tabelle 3.12: Technische Daten der DASbox®-Bioreaktoranlage und Standardkultivierungsbedingungen mit Glucose oder Xylose als Substrat.	28
Tabelle 3.13: Zuckerreferenzstandard für den Säureaufschluss mit 72 %iger Schwefelsäure.	31
Tabelle 3.14: Kultivierungsbedingungen im Screening mit Xylan als Modellsubstrat. Durchgeführt in 96-Well MTP.	32
Tabelle 3.15: Medienzusätze für das Ultra- und Nanofiltrat.	34
Tabelle 3.16: Matrix, aktive Gruppen und typische Anwendungen der vier getesteten Anionentauscher.....	34
Tabelle 3.17: Zusammensetzung und Hydrolysebedingung der Hydrolyseansätze mit ProtiGrain® und Rapsschrot. Durchführung nach Klotz 2017.....	38
Tabelle 3.18: Zusammensetzung des Vitaminzusatzes.....	39
Tabelle 3.19: Zusammensetzung des Aminosäurezusatzes.....	40
Tabelle 3.20: GC-FID Systemkomponenten.	43
Tabelle 3.21: GC-FID-Methode zur Bestimmung der freien Aminosäuren.....	44
Tabelle 3.22: Liste der Komponenten des verwendeten HPLC-Systems zur quantitativen Bestimmung der Substrate, Produkte und Nebenprodukte.....	45

Tabelle 3.23: HPLC-Methode zur Bestimmung der Substrate, Produkte und Nebenprodukte.	45
Tabelle 3.24: Liste der Komponenten des verwendeten HPLC-Systems zur Bestimmung der Holz-Hydrolysatnebenprodukte.....	46
Tabelle 3.25: HPLC-Methode zur Bestimmung der Holz-Hydrolysatnebenprodukte.....	46
Tabelle 3.26: Liste der Komponenten des verwendeten HPAEC-PAD-Systems.....	47
Tabelle 3.27: HPAEC-PAD-Methode zur Bestimmung der Monosaccharide.	47
Tabelle 3.28: Bedingungen der ICP-OES-Messung.....	48
Tabelle 3.29: Wellenlängen und Messmodi der verwendeten ICP-OES-Methode.....	49
Tabelle 3.30: IC-Systemkomponenten und Methoden zur Bestimmung von Anionen und Kationen.	50
Tabelle 3.31: GC-MS Systemkomponenten.	51
Tabelle 3.32: GC-MS-Methode zur Bestimmung der 2,3-BDO-Stereoisomere.	51
Tabelle 4.1: Auswahl von Bakterien aufgrund ihrer phylogenetischen Abstammung.	54
Tabelle 4.2: 2,3-BDO- und Acetoinbildung mit 50 g/L Glucose als einzige Kohlenstoffquelle der nach dem phylogenischen Abstammungsverhältnis ausgewählten Stämme. Kultivierung mit Basal-HE-Medium im 300 mL Schüttelkolben mit 3 Schikanen, einem Füllvolumen von 60 mL, einer Schüttel-frequenz von 125 rpm und einem Start-pH-Wert von $6,6 \pm 0,1$	58
Tabelle 4.3: 2,3-BDO- und Acetoinbildung mit 50 g/L Xylose als einzige Kohlenstoffquelle der nach dem phylogenetischen Abstammungsverhältnis ausgewählten Stämme. Kultivierung Basal-HE-Medium mit 0,15 M Phosphatpuffer im 300 mL Schüttelkolben mit 3 Schikanen, einem Füllvolumen von 60 mL, einer Schüttelfrequenz von 125 rpm und einem Start-pH-Wert von $6,6 \pm 0,1$	60
Tabelle 4.4: Bestimmung der 2,3-BDO-Stereoisomere verschiedener Stämme mittels GC/MS.	67
Tabelle 4.5: Stammzuordnung und Charakterisierung der Eigenisolate GB 1, LB 10, B 1-7 und GK 16.	69
Tabelle 4.6: Vorauswahl der gescreenten Stämme.	70
Tabelle 4.7: Holz-Hydrolysatnebenprodukte in typischen Konzentrationen (nach Jurchescu 2014).	75
Tabelle 4.8: Verwertbarkeit der wichtigsten Zucker aus Laub- und Nadelhölzern von <i>B. licheniformis</i> DSM 8785, <i>B. atrophaeus</i> NRS-213, <i>B. mojavensis</i> B-14698 und <i>B. vallismortis</i> B-14891. Die einge-setzte Substratkonzentration betrug $56,7 \pm 4,1$ g/L.	82

Tabelle 4.9: Angepasste Medienzusammensetzung nach Variation einzelner Mediensubstanzen mit den Stämmen <i>B. licheniformis</i> DSM 8785, <i>B. atrophaeus</i> NRS-213, <i>B. mojavensis</i> B-14698 und <i>B. vallismortis</i> B-14891. Kultivierung in 96-Well MTP bei 39 °C und 700 rpm für 30 h und einer Glucosestartkonzentration von 100 g/L. Änderungen in der Substanzkonzentration gegenüber dem Basal-HE-Medium sind fett markiert.....	88
Tabelle 4.10: pH-Werte nach 30 h Kultivierung von <i>B. licheniformis</i> DSM 8785, <i>B. atrophaeus</i> NRS-213, <i>B. mojavensis</i> B-14698 und <i>B. vallismortis</i> B-14891 in Abhängigkeit der Hefeextraktkonzentration im Basal-HE-Medium. Kultivierung in 96-Well MTP bei 39 °C und 700 rpm für 30 h und einer Glucosestartkonzentration von 100 g/L.	90
Tabelle 4.11: Abweichung der initialen Glucosekonzentration von den Soll-Werten für die Kultivierungen mit <i>B. atrophaeus</i> NRS-213, <i>B. mojavensis</i> B-14698 und <i>B. vallismortis</i> B-14891. Kultivierung in 96-Well MTP bei 39 °C und 700 rpm.	94
Tabelle 4.12: Verhältnis von Acetoin zu 2,3-BDO bei Kultivierungen mit unterschiedlichen initialen Glucosekonzentrationen mit <i>B. atrophaeus</i> NRS-213, <i>B. mojavensis</i> B-14698 und <i>B. vallismortis</i> B-14891. Kultivierung in 96-Well MTP bei 39 °C und 700 rpm...	96
Tabelle 4.13: Ausbeute und Produktivität bezogen auf die Produktbildung (2,3-BDO + Acetoin) bei Kultivierungen mit unterschiedlichen initialen Glucosekonzentrationen mit den Stämmen <i>B. atrophaeus</i> NRS-213, <i>B. mojavensis</i> B-14698 und <i>B. vallismortis</i> B-14891. Kultivierung in 96-Well MTP bei 39 °C und 700 rpm.....	98
Tabelle 4.14: Produktkonzentrationen (2,3-BDO + Acetoin) bei der Kultivierung von <i>B. vallismortis</i> B-14891 mit Ammoniumsulfat, Aminosäuren (AS) und Vitaminen (Vit). Kultivierung in 24-Well MTP bei 37 °C und 320 rpm. Kultivierungen im Doppelansatz.....	108
Tabelle 4.15: Produktivitäten (P) nach 8 h und maximale Produktkonzentrationen (2,3-BDO und Acetoin) bei der Kultivierung von <i>B. vallismortis</i> B-14891 mit Rapsschrot und Proti Grain® sowie mit reduziertem Rapsschrot und Proti Grain® mit Vitamin- und Aminosäurezusatz. Die eingesetzten Mengen beziehen sich jeweils auf den Stickstoffgehalt in 10 g/L bzw. 1 g/L Hefeextrakt. Kultivierung in 24-Well MTP bei 37 °C, 320 rpm und 1 mL Füllvolumen. Kultivierungen im Doppelansatz.	109
Tabelle 4.16: Probenahmezeitpunkte und Zeitpunkte der Glucoselimitierung (ermittelt über die online CTR) für die pH-Endwertreglungen mit <i>B. vallismortis</i> B-14891 mit Glucose als einzige Kohlenstoffquelle.	110
Tabelle 4.17: Produktverteilung von <i>B. vallismortis</i> B-14891 bei 500 rpm/5 % O ₂ , 600 rpm/21 % O ₂ und 800 rpm/30 % O ₂ nach 21,5 h Kultivierungsdauer. Kultivierung im 250 mL Reaktor mit einem Füllvolumen von 100 mL, einer Begasungsrate von 25 sL/h und einem Start-pH-Wert von 6,6 ± 0,1. Die initiale Glucosekonzentration betrug 100 g/L.....	116

Tabellenverzeichnis

Tabelle 4.18: Ausbeute und Produktivität bezogen auf die Produktbildung (2,3-BDO + Acetoin) und Glucosekonzentration zum Zeitpunkt der letzten Probenahme bei Kultivierungen mit unterschiedlichen initialen Glucosekonzentrationen mit <i>B. vallismortis</i> B-14891. Kultivierung in 96-Well MTP und im DASbox®-Reaktorsystem.	122
Tabelle 4.19: Spezifischer Glucoseumsatz, 2,3-BDO-Produktivität und -Ausbeute der Fed-Batch-Kultivierung mit <i>B. vallismortis</i> B-14891 mit vier Feeds mit je 50 g/L Glucose (Glu) und Feed 2 und 4 mit zusätzlich 10 g/L Hefeextrakt (HE).....	124
Tabelle 4.20: Zuckermonomere in den drei Fraktionen des Hemicellulose-Hydrolysats nach enzymatischem Aufschluss.	138
Tabelle 4.21: Zuckermonomere im Ultra- und Nanofiltrat nach Säurehydrolyse.	139
Tabelle 4.22: Nebenproduktkonzentrationen in den drei Hydrolysatfraktionen.....	140
Tabelle 4.23: Einfluss der Acetatkonzentration im Basal-HE-Medium auf die Produktivitäten und Produktausbeuten (2,3-BDO und Acetoin) von <i>B. vallismortis</i> B-14891. Kultivierung in 96-Well MTP bei 37 °C, 700 rpm, einem Füllvolumen von 200 µL mit 50 g/L Xylose für 24 h. Mittelwerte aus zwei Kultivierungen.	141
Tabelle 4.24: Einfluss der Syringaldehydkonzentration im Basal-HE-Medium auf die Produktivitäten (2,3-BDO und Acetoin) von <i>B. vallismortis</i> B-14891. Kultivierung in 96-Well MTP bei 37 °C, 700 rpm, einem Füllvolumen von 200 µL mit 50 g/L Xylose für 24 h. Mittelwerte der Referenz aus 10 Messungen und der Proben aus zwei Messungen.....	144
Tabelle A 1: 2,3-BDO- + Acetoinausbeute und Acetatbildung von <i>B. licheniformis</i> DSM 8785 mit 16 verschiedenen Substraten als einzige Kohlenstoffquelle. Kultivierung in 96-Well MTP bei 39 °C, 700 rpm und einer Startsubstrat-konzentration von $56,7 \pm 4,1$ g/L.....	186
Tabelle A 2: 2,3-BDO- + Acetoinausbeute und Acetatbildung von <i>B. mojavensis</i> B-14698 mit 16 verschiedenen Substraten als einzige Kohlenstoffquelle. Kultivierung in 96-Well MTP bei 39 °C, 700 rpm und einer Startsubstrat-konzentration von $56,7 \pm 4,1$ g/L.	187
Tabelle A 3: 2,3-BDO- + Acetoinausbeute und Acetatbildung von <i>B. atrophaeus</i> NRS-213 mit 16 verschiedenen Substraten als einzige Kohlenstoffquelle. Kultivierung in 96-Well MTP bei 39 °C, 700 rpm und einer Startsubstrat-konzentration von $56,7 \pm 4,1$ g/L.	188
Tabelle A 4: 2,3-BDO- + Acetoinausbeute und Acetatbildung von <i>B. vallismortis</i> B-14891 mit 16 verschiedenen Substraten als einzige Kohlenstoffquelle. Kultivierung in 96-Well	

MTP bei 39 °C, 700 rpm und einer Startsubstrat-konzentration von $56,7 \pm 4,1$ g/L.	189
Tabelle A 5: An- und Kationenkonzentration im Ultra- und Nanofiltrat.....	190
Tabelle A 6: Spurenelementanalyse der drei Hydrolysate.....	191

Literatur

Alam S, Capit F, Weigand WA, Hong J. Kinetics of 2,3-butanediol by *Bacillus amyloliquefaciens*: Effect of initial substrate concentration and aeration. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 1990; 47(1): 71-84.

Anders N. Hydrolyse von agrarischen Rest- und Rohstoffen - Katalysatorscreening für die Verzuckerung von Weizenkaff. Dissertation. Technische Universität Braunschweig 2014.

Ash C, Farrow JAE, Wallbanks S, Collins MD. Phylogenetic heterogeneity of the genus *Bacillus* revealed by comparative analysis of small-subunit-ribosomal RNA sequences. *Letters in Applied Microbiology* 1991; 13(4): 202-206.

Afschar AS, Bellgardt KH, Rossell CE, Czok A, Schaller K. The production of 2,3-butanediol by fermentation of high test molasses. *Applied Microbiology and Biotechnology* 1991; 34: 582-585.

Axe DD, Bailey JE. Transport of lactate and acetate through the energized cytoplasmic membrane of *Escherichia coli*. *Biotechnology and Bioengineering* 1995; 47(1): 8-19.

Białkowska AM. Strategies for efficient and economical 2,3-butanediol production: new trends in this field. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 2016; 32:200.

Biebl H, Zeng AP, Menzel K, Deckwer WD. Fermentation of glycerol to 1,3-propanediol and 2,3-butanediol by *Klebsiella pneumoniae*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 1998; 50(1): 24-29.

Blomqvist K, Nikkola M, Lethtovaara P, Suihko ML, Airaksinen U, Straby KB, Knowles JKC, Penttilä ME. Characterization of the genes of the 2,3-butanediol operons from *Klebsiella terrigena* and *Enterobacter aerogenes*. *Journal of Bacteriology* 1993; 175(5): 1392-1404.

Booth IR. Regulation of Cytoplasmic pH in bacteria. *Microbiological Reviews* 1985; 49(4): 359-378.

Bosma EF, van der Oost J, de Vos WM, van Kranenburg R. Sustainable Production of Bio-Based Chemicals by extremophiles. *Current Biotechnology* 2013; 2(4): 360-379.

Capellán-Pérez I, Mediavilla M, de Castro C, Carpintero Ó, Miguel LJ. More Growth? An unfeasible option to overcome critical energy constraints and climate change. *Sustainability Science* 2015; 10(3): 397-411.

Celinska E, Grajek W. Biotechnological production of 2,3-butanediol – current state and prospects. *Biotechnology Advances* 2009; 27(6): 715-725.

Chen H. Chemical Composition and Structure of Natural Lignocellulose. *Biotechnology of Lignocellulose* Springer, Dordrecht 2014.

Chen F, Dixon RA. Lignin modification improves fermentable sugar yields for biofuel production. *Nature Biotechnology* 2007; 25(7): 759-761.

Converti A, Perego P. Use of energy balances in the study of the anaerobic metabolism of *Enterobacter aerogenes* at the variable starting glucose concentrations. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2002; 59(2-3): 303-309.

Converti A, Perego P, Del Borghi M. Effect of Specific Oxygen Uptake Rate on *Enterobacter aerogenes* Energetics: Carbon and Reduction Degree Balances in Batch Cultivation. *Biotechnology and Bioengineering* 2003; 82(3): 370-377.

Diez-Gonzalez F, Russel JB. The ability of *Escherichia coli* 0157:H7 to decrease its intracellular pH and resist the toxicity of acetic acid. *Microbiology* 1997; 143(4): 1175-1180.

Eichhorn SJ, Baillie CA, Zafeiropoulos N, Mwaikambo LY, Ansell MP, Dufresne A, Entwistle KM, Herrera-Franco PJ, Escamilla GC, Groom L, Hughes M, Hill C, Rials TG, Wild PM. Review: Current international research into cellulosic fibres and composites. *Journal of Materials Science* 2001; 36(9): 2107-2131.

Emerson RR, Flickinger MC, Tsao GT. Kinetics of dehydration of aqueous 2,3-butanediol to methyl ethyl ketone. *Industrial and Engineering Chemistry Product Research and Development* 1982; 21(3): 473-477.

Esener AA, Roels JA, Kossen NWF. The influence of temperature on the maximum specific growth rate of *Klebsiella pneumoniae*. *Biotechnology and Bioengineering* 1981; 23(6): 1401-1405.

Farinas CS, Loyo MM, Baraldo A Jr, Tardioli PW, Neto VB, Couri S. 2010. Finding stable cellulase and xylanase: evaluation of the synergistic effect of pH and temperature. *New Biotechnology* 2010; 27(6): 810-815.

Fu J, Wang Z, Chen T, Liu W, Shi T, Wang G, Tang Y, Zhao X. NADH plays the vital role for chiral pure D-(-)-2,3-butanediol production in *Bacillus subtilis* under limited oxygen conditions. *Biotechnology and Bioengineering* 2014; 111(10): 2126-2131.

Fu J, Huo G, Feng L, Mao Y, Wang Z, Ma H, Chen T, Zhao X. Metabolic engineering of *Bacillus subtilis* for chiral pure meso-2,3-butanediol production. *Biotechnology for Biofuels* 2016; 9:90.

Fuchs G. Allgemeine Mikrobiologie. 8. Auflage 2006. Begründet von Schlegel HG. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, Deutschland.

Frazer FR, McCaskey TA. Effect of components of acid-hydrolysed hardwood on conversion of D-xylose to 2,3-butanediol by *Klebsiella pneumoniae*. *Enzyme and Microbial Technology* 1991; 13(2): 110-115.

- Fujimoto N, Kosaka T, Nakao T, Yamada M. *Bacillus licheniformis* bearing a high cellulose-degrading activity, which was isolated as a heat-resistant and micro-aerophilic microorganism from bovine rumen. *The Open Biotechnology Journal* 2011;5: 7-13.
- Garg SK, Jain A. Fermentative production of 2,3-butanediol: A review. *Bioresource Technology* 1995; 51(2-3): 103-109
- Giovannini PP, Mantovani M, Medici A, Pedrini P. Production of 2,3-butanediol by *Bacillus stearothermophilus*: fermentation and metabolic pathway. *Chemical Engineering Journal* 2008; 14: 281-286.
- Gírio FM, Fonseca C, Carneiro F, Duarte LC, Marques S, Bogel-Lukasik R. Hemicelluloses for fuel ethanol: A review. *Bioresource Technology* 2010; 101(13): 4775-4800.
- Grover BP, Garg SK, Verma J. Production of 2,3-butanediol from wood hydrolysate by *Klebsiella pneumoniae*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 1990; 6(3): 328-332.
- Guragain YN, Chitta D, Karanjikar M, Vadlani PV. Appropriate lignocellulosic biomass processing strategies for efficient 2,3-butanediol production from biomass-derived sugars using *Bacillus licheniformis* DSM 8785. *Food and Bioprocess Technology* 2017; 104: 147-158.
- Häßler T, Schieder D, Pfaller R, Faulstich M, Sieber V. Enhanced fed-batch fermentation of 2,3-butanediol by *Paenibacillus polymyxa* DSM 365. *Bioresource Technology* 2012; 124: 237-244.
- Heipieper HJ, Weber FJ, Sikkema J, Keweloh H, de Bont JAM. Mechanisms of resistance of whole cells to toxic organic solvents. *Trends in Biotechnology* 1994; 12(10): 409-415.
- Hespell RB. Fermentation of xylan, corn fiber, or sugars to acetoin and butanediol by *Bacillus polymyxa* strains. *Current Microbiology* 1996; 32(5): 291-296.
- Jansen NB, Flickinger MC, Tsao GT. Production of 2,3-butanediol from D-xylose by *Klebsiella oxytoca* ATCC 8724. *Biotechnology and Bioengineering* 1984; 26(4): 362-9.
- Ji XJ, Huang H, Ouyang PK. Microbial 2,3-butanediol production: A state-of-the-art review. *Biotechnology Advances* 2011; 29(3): 351-364.
- Ji XJ, Huang H, Zhu JG, Ren LJ, Nie ZK, Du J, Li S. Engineering *Klebsiella oxytoca* for efficient 2,3-butanediol production through insertional inactivation of acetaldehyde dehydrogenase gene. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2010; 85(6): 1751-1758.
- Jiang LQ, Fang Z, Zhao ZL, He F, Li HB. 2,3-butanediol and acetoin production from enzymatic hydrolysate of ionic liquid-pretreated cellulose by *Paenibacillus polymyxa* *Bioresources* 2015; 10(1): 1318-1329.

- Jönsson LJ, Palmqvist E, Nilvebrant NO, Hahn-Hägerdal B. Detoxification of wood hydrolysates with laccase and peroxidase from the white-rot fungus *Trametes versicolor*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 1998; 49(6): 691–697.
- Jurchescu IM, Hamann J, Zhou X, Ortmann T, Kuenz A, Prüße U, Lang S. Enhanced 2,3-butanediol production in fed-batch cultures of free and immobilized *Bacillus licheniformis* DSM 8785. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2013; 97: 6715-6723.
- Jurchescu IM. 2,3-Butanediol Production with GRAS Microorganisms – Screening, Cultivation, Optimization and Scale-Up. Dissertation. Technische Universität Braunschweig 2014.
- Klotz S. Biotechnisch erzeugte D-Milchsäure - Substitution von Hefeextrakt durch agrarische Rohstoffhydrolysate. Dissertation. Technische Universität Braunschweig 2017.
- Kobayashi H, Fukuoka A. 2013. Synthesis and utilisation of sugar compounds derived from lignocellulosic biomass. *Green Chemistry* 2013; 15: 1740-1763.
- Koutinas AA, Yopez B, Kopsahelis N, Freire DMG, Machado de Castro A, Papanikolaou S, Kookos IK. Techno-economic evaluation of a complete bioprocess for 2,3-butanediol production from renewable resources. *Bioresource Technology* 2016; 204: 55–64.
- Laine C. Structures of hemicelluloses and pectins in wood and pulp. Dissertation. Technische Universität Helsinki 2005.
- Laube VM, Groleau D, Martin SM. 2,3-Butanediol production from xylose and other hemicellulosic components by *Bacillus polymyxa*. *Biotechnology Letters* 1984; 6(4): 257-262.
- Li J, Wang W, Ma Y, Zeng AP. Medium optimization and proteome analysis of (R,R)-2,3-butanediol production by *Paenibacillus polymyxa* ATCC 12321. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2013a; 97(2): 585-597.
- Li L, Zhang L, Li K, Wang Y, Gao C, Han B, Ma C, Xu P. A newly isolated *Bacillus licheniformis* strain thermophilically produces 2,3-butanediol, a platform and fuel bio-chemical. *Biotechnology for Biofuels* 2013b; 6:123.
- Li L, Li K, Wang K, Chen C, Gao C, Ma C, Xu P. Efficient production of 2,3-butanediol from corn stover hydrolysate by using a thermophilic *Bacillus licheniformis* strain. *Bioresource Technology* 2014; 170: 256-261.
- Lindner C, Stülke J, Hecker M. Regulation of xylanolytic enzymes in *Bacillus subtilis*. *Microbiology* 1994; 140: 753-57.
- López J, Fortnagel P. The regulation of the Butanediol cycle in *Bacillus subtilis*. *Biochimica et Biophysica Acta* 1972; 279: 554-560.

- Liu X, Fabos V, Taylor S, Knight DW, Whiston K, Hutchings GJ. One-Step Production of 1,3-Butadiene from 2,3-Butanediol Dehydration. *Chemistry a European Journal* 2016; 22(35): 12290-12294.
- Maddox IS. Microbial Production of 2,3-Butanediol. Kapitel 7 in *Biotechnology: Products of Primary Metabolism*, Volume 6, Second Edition (eds Rehm HJ und Reed G) 1996. Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim, Deutschland.
- Ma CQ, Wang AL, Qin JY, Li LX, Ai XL, Jiang TY. Enhanced 2,3-butanediol production by *Klebsiella pneumoniae* SDM. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2009; 82(1): 49-57
- Magee RJ, Kosaric N. The microbial production of 2,3-butanediol. *Advances in Applied Microbiology* 1987; 32: 89-161.
- Marwoto B, Nakashimada Y, Kakizono T, Nishio N. Enhancement of (R,R)-2,3-butanediol production from xylose by *Paenibacillus polymyxa* at elevated temperatures. *Biotechnology Letters* 2002; 24(2): 109-114.
- Marwoto B, Nakashimada Y, Kakizono T, Nishio N. Metabolic analysis of acetate accumulation during xylose consumption by *Paenibacillus polymyxa*. *Applied Microbiology Biotechnology* 2004; 64(1): 112-119.
- McKendry P. Energy production from biomass (part 1): overview of biomass. *Bioresource Technology* 2002; 83(1): 37-46.
- De Mas C, Jansen NB, Tsao GT. Production of Optically Active 2,3-BDO by *Bacillus polymyxa*. *Biotechnology and Bioengineering* 1988; 31(4): 366-377.
- Mickelson M, Werkman CH. Influence of pH on the Dissimilation of Glucose by *Aerobacter indologenes*. *Journal of Bacteriology* 1938; 36(1): 67-76.
- Moes J, Griot M, Keller J, Heinzle E, Dunn IJ, Bourne JR. A microbial culture with oxygensensitive product distribution as a potential tool for characterizing bioreactor oxygen transport. *Biotechnology and Bioengineering* 1985; 27(4): 482-9.
- Nadal I, Rico J, Pérez-Martínez G, Yebra MJ, Monedero V. Diacetyl and acetoin production from whey permeate using engineered *Lactobacillus casei*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 2009; 36(9): 1233-1237.
- Nakano MM, Dailly YP, Zuber P, Clark DP. Characterization of anaerobic fermentative growth of *Bacillus subtilis*: Identification of fermentation end products and genes required for growth. *Journal of Bacteriology* 1997; 179(21): 6749-6755.
- Nakashimada Y, Kanai K, Nishio N. Optimization of dilution rate, pH and oxygen supply on optical purity of 2,3-butanediol produced by *Paenibacillus polymyxa* in chemostat culture. *Biotechnology Letter* 1998; 20(12): 1133-1138.

Nakashimada Y, Marwoto B, Kashiwamura T, Kakizono T, Nishio N. Enhanced 2,3-Butanediol Production by Addition of Acetic Acid in *Paenibacillus polymyxa*. Journal of Bioscience and Bioengineering 2000; 90(6):661-664.

Nazina TN, T. P. TP, Poltarau AB, Novikova EV, Grigoryan AA, Ivanova AE, Lysenko AM, Petrunyaka VV, Osipov GA, Belyaev SS, Ivanov MV. Taxonomic study of aerobic thermophilic bacilli: descriptions of *Geobacillus subterraneus* gen. nov., sp. nov. and *Geobacillus uzenensis* sp. nov. from petroleum reservoirs and transfer of *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus thermocatenulatus*, *Bacillus thermoleovorans*, *Bacillus kaustophilus*, *Bacillus thermoglucosidasius* and *Bacillus thermodenitrificans* to *Geobacillus* as the new combinations *G. stearothermophilus*, *G. thermocatenulatus*, *G. thermoleovorans*, *G. kaustophilus*, *G. thermoglucosidasius* and *G. thermodenitrificans*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 2001; 51: 433-446.

Nishikawa NK, Sutcliffe R, Saddler JN. The Effect of Wood-Derived Inhibitors on 2,3-Butanediol Production by *Klebsiella pneumoniae*. Biotechnology and Bioengineering 1988; 31(6): 624-627.

Öhgren K, Bura R, Lesnicki G, Saddler J, Zacchi G. A comparison between simultaneous saccharification and fermentation and separate hydrolysis and fermentation using steam-pretreated corn stover. Process Biochemistry 2007; 42(5): 834-839.

Okonkwo CC, Ujor V, Ezeji TC. Investigation of relationship between 2,3-butanediol toxicity and production during growth of *Paenibacillus polymyxa*. New Biotechnology 2017; 34: 23-31.

Palmqvist E, Hahn-Hägerdal B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. I: inhibition and detoxification. Bioresource Technology 2000a; 74(1): 17-24.

Palmqvist E, Hahn-Hägerdal B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: inhibitors and mechanisms of inhibition. Bioresource Technology 2000b; 74(1): 25-33.

Perego P, Converti A, Del Borghi A, Canepa P. 2,3-Butanediol production by *Enterobacter aerogenes*: selection of the optimal conditions and application to food industry residues. Bioprocess Engineering 2000; 23(6): 613-620.

Perego P, Converti A, Del Borghi M. Effects of temperature, inoculum size and starch hydrolyzate concentration on butanediol production by *Bacillus licheniformis*. Bioresource Technology 2003; 89(2): 125-131.

Ricke SC. Perspectives on the use of organic acids and short chain fatty acids as antimicrobials. Poultry Science 2003; 82(4): 632-639.

Raspoet D, Pot B, De Deyn D, De Vos P, Kersters K, De Ley J. Differentiation Between 2,3-Butanediol Producing *Bacillus licheniformis* and *B. polymyxa* Strains by Fermentation Product Profiles and Whole-Cell Protein Electrophoretic Patterns. Systematic and Applied Microbiology 1991; 14(1): 1-7

Sablayrolles JM, Goma G. Butanediol production by *Aerobacter aerogenes* NRRL B199: Effects of initial substrate concentration and aeration agitation. *Biotechnology and Bioengineering* 1984; 26(2): 148-155.

Sheldon RA. Green and sustainable manufacture of chemicals from biomass: state of the art. *Green Chemistry*. 2014; 16:950-963.

Singh A, Mishra P. Microbial production of 2,3-butanediol. *Current Applications in Biotechnology* 1995; 33: 221-247.

Syu MJ. Biological production of 2,3-butanediol. *Applied Microbiology Biotechnology* 2001; 55: 10-18.

Taherzadeh MJ, Karimi K. Pretreatment of Lignocellulosic Wastes to Improve Ethanol and Biogas Production: A Review. *International Journal of Molecular Sciences* 2008; 9(9): 1621–1651.

Teixeira de Mattos MJ, Tempest DW. Metabolic and energetic aspects of the growth of *Klebsiella aerogenes* NCTC 418 on glucose in anaerobic chemostat culture. *Archives of Microbiology* 1983; 134(1): 80-85.

Thomson FM, Booth IR. Control of butane-2,3-diol formation in *Klebsiella aerogenes*. *Biochemical Society Transactions* 1982; 10(6): 465-466.

Tran AV, Chambers RP. The dehydration of fermentative 2,3-butanediol into methyl ethyl ketone. *Biotechnology and Bioengineering* 1987; 29(3): 343–351.

Villet R. *Biotechnology for Producing Fuels and Chemicals from Biomass. Vol. II - Fermentation Chemicals from Biomass. Technischer Forschungsbericht* 1981; Solar Energy Research Institute (SERI)

Voloch M, Jansen N, Ladisch M, Tsao G, Narayan R, Rodwell V. 2,3-Butanediol. In: Moo-Young M CC, Humphrey AE (eds) *Comprehensive Biotechnology* 1985; 933-947.

Wikberg H, Maunu SL. Characterisation of thermally modified hard- and softwoods by ¹³C CPMAS NMR. *Carbohydrate Polymers* 2004; 58(4): 461-466.

Wong CL, Yen HW, Lin CL, Chang JS. Effects of pH and fermentation strategies on 2,3-butanediol production with an isolated *Klebsiella* sp. Zmd30 strain. *Bioresource Technology* 2014; 152: 169-76.

Xiao Z, Wang X, Huang Y, Huo F, Zhu X, Xi L, Lu JR. Thermophilic fermentation of acetoin and 2,3-butanediol by a novel *Geobacillus* strain. *Biotechnology for Biofuels* 2012; 5:88.

Xiao Z, Xu P. Acetoin Metabolism in Bacteria. *Critical Reviews in Microbiology* 2007; 33(2): 127-140.

- Yang H, Yan R, Chen H, Lee DH, Zheng C. Characteristics of hemicellulose, cellulose and lignin pyrolysis. *Fuel* 2007; 86(12-13): 1781-1788.
- Yang TW, Rao ZM, Zhang X, Xu MJ, Xu ZH, Yang ST. Fermentation of biodiesel-derived glycerol by *Bacillus amyloliquefaciens*: effects of co-substrates on 2,3-butanediol production. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2013; 97(17): 7651-7658.
- Yang TW, Rao ZM, Zhang X, Lin Q, Xia H, Xu ZH, Yang ST. Production of 2,3-butanediol from glucose by GRAS microorganism *Bacillus amyloliquefaciens*. *Journal of Basic Microbiology* 2011; 51: 650–658
- Yen HW, Li FT, Chang JS. The effects of dissolved oxygen level on the distribution of 1,3-propanediol and 2,3-butanediol produced from glycerol by an isolated indigenous *Klebsiella* sp. Ana-WS5. *Bioresource Technology* 2014; 153: 374-378.
- Yong JY, Klemeš JJ, Varbanov PS, Huisingh D. Cleaner energy for cleaner production: modelling, simulation, optimisation and waste management. *Journal of Cleaner Production* 2016; 111: 1-16.
- Yu EK, Saddler JN. Enhanced production of 2,3-butanediol by *Klebsiella pneumoniae* grown on high sugar concentrations in the presence of acetic acid. *Applied and Environmental Microbiology* 1982; 44(4): 777-784.
- Zaldivar J, Martinez A, Ingram LO. Effect of selected aldehydes on the growth and fermentation of ethanologenic *Escherichia coli*. *Biotechnology and Bioengineering* 1999; 65(1): 24-33.
- Zeng AP, Biebl H, Deckwer WD. 2,3-Butanediol production by *Enterobacter aerogenes* on continuous culture: role of oxygen supply. *Applied Microbiology and Biotechnology* 1990a; 33(3): 264-268
- Zeng AP, Biebl H, Deckwer WD. Effect of pH and acetic acid on growth and 2,3-butanediol production of *Enterobacter aerogenes* in continuous culture. *Applied Microbiology and Biotechnology* 1990b; 33(5): 485-489.
- Zeng AP, Biebl H, Deckwer WD. Production of 2,3-butanediol in a membrane bioreactor with cell recycle. *Applied Microbiology and Biotechnology* 1991; 34(4): 463-468.
- Zeng AP, Byun TG, Posten C, Deckwer WD (1994). Use of respiratory quotient as a control parameter for optimum oxygen supply and scale-up of 2,3-butanediol production under microaerobic conditions. *Biotechnology Bioengineering* 1994; 44(9): 1107-1114.
- Zha Y, Westerhuis JA, Muilwijk B, Overkamp KM, Nijmeijer BM, Coulter L, Smilde AK, Punt PJ. Identifying inhibitory compounds in lignocellulosic biomass hydrolysates using an exometabolomics approach. *BMC Biotechnology* 2014; 14:22: 1-16.

Literatur

Zhang LY, Sun JA, Hao YL, Zhu JW, Chu J, Wei DZ, Shen Y. Microbial production of 2,3-butanediol by a surfactant (serrawettin)-deficient mutant of *Serratia marcescens* H30. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 2010; 37(8): 857-862.

Anhang

Leibniz-Institut
DSMZ-Deutsche Sammlung von
Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH



Identifizierung des Isolates GB1
(DSM ID 16-93)

24.03.16

Bacillus subtilis

Eigenschaften des Stammes

Zellform	Stäbchen	Indolreaktion	-
Breite μm	0,7-0,8	Phenylalanin-desaminase	-
Länge μm	2,5-3,5	Arginindihydrolase	-
Gramverhalten	+	Nitratreduktion	+
Katalase	+	Gasbildung aus Glucose	-
		Lecithinase	-
Sporen	+	ERGEBNIS: Isolat GB1	
Anaerobes Wachstum	-	= <i>Bacillus subtilis</i>	
VP Reaktion	-	Das Profil der zellulären Fettsäuren ist	
pH in VP-Medium	6,0	typisch für dieses Taxon.	
Wachstum bei		Die partielle Sequenzierung der	
40°C	+	16SrDNA ergab eine Ähnlichkeit von	
50°C	+	99,9% zu den Typstämmen von <i>B.</i>	
Wachstum in		<i>subtilis</i> und <i>B. tequilensis</i> .	
Medium pH 5.7	+	Die phänotypischen Tests weisen auf	
NaCl 2%	+	<i>Bacillus subtilis</i> hin.	
5%	+		
7%	+		
10%	+		
Lysozym-Medium	+		
Säure aus (ASS)			
D-Glucose	+		
L-Arabinose	+		
D-Xylose	+		
D-Mannit	+		
D-Fructose	+		
Hydrolyse von			
Stärke	+		
Gelatine	+		
Casein	+		
Tween 80	+		
Esculin	+		
Verwertung von			
Citrat	+		
Propionat	-		

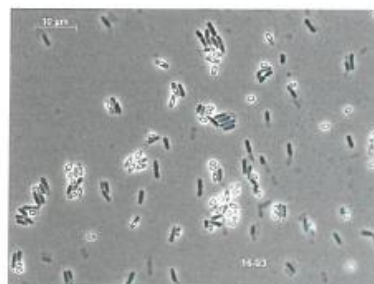


Abbildung A 1: Stammidentifikation der DSMZ für das Eigenisolat GB 1.

Leibniz-Institut
DSMZ-Deutsche Sammlung von
Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH



Identifizierung des Isolates LB 10
(DSM ID 16-94)

24.03.16

Bacillus licheniformis

Eigenschaften des Stammes

Zellform	Stäbchen	Verwertung von	
Breite μm	0,7-0,8	Citrat	+
Länge μm	2,0-3,0	Propionat	w
Gramverhalten	+	Indolreaktion	-
Katalase	+	Phenylalanin-desaminase	-
Sporen	+	Arginindihydrolase	+
Anaerobes Wachstum	+	Nitratreduktion	+
VP Reaktion	+	Gasbildung aus Glucose	-
pH in VP-Medium	5,6	Lecithinase	-
Wachstum bei		ERGEBNIS: Isolat LB 10	
40°C	+	= <i>Bacillus licheniformis</i>	
50°C	+		
55°C	+	Das Profil der zellulären Fettsäuren ist	
		typisch für dieses Taxon.	
Wachstum in		Die partielle Sequenzierung der	
Medium pH 5.7	+	16SrDNA ergab eine Ähnlichkeit von	
NaCl 2%	+	99,9% zu <i>B. licheniformis</i> .	
5%	+		
7%	+	Die phänotypischen Tests bestätigen	
10%	w	diese Zuordnung.	
Lysozym-Medium	+	Abkürzung: W = schwache Reaktion	
Säure aus (ASS)			
D-Glucose	+		
L-Arabinose	+		
D-Xylose	+		
D-Mannit	+		
D-Fructose	+		
Hydrolyse von			
Stärke	+		
Gelatine	+		
Casein	w		
Tween 80	+		
Esculin	+		

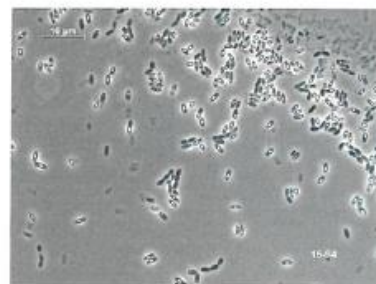


Abbildung A 2: Stammidentifikation der DSMZ für das Eigenisolat LB 10.

Leibniz-Institut
DSMZ-Deutsche Sammlung von
Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH



Identifizierung des Isolates B1-7
(DSM ID 16-95)

24.03.16

Bacillus licheniformis

Eigenschaften des Stammes

Zellform	Stäbchen	Verwertung von	
Breite μm	0,7-0,8	Citrat	+
Länge μm	2,0-3,0	Propionat	-
Gramverhalten	+	Indolreaktion	-
Katalase	+	Phenylalanin-desaminase	-
Sporen	+	Arginindihydrolase	-
Anaerobes Wachstum	+	Nitratreduktion	+
VP Reaktion	+	Gasbildung aus Glucose	-
pH in VP-Medium	5,5	Lecithinase	-
Wachstum bei		ERGEBNIS: Isolat B1-7	
40°C	+	= <i>Bacillus licheniformis</i>	
50°C	+	Das Profil der zellulären Fettsäuren ist	
55°C	+	typisch für dieses Taxon.	
Wachstum in		Die partielle Sequenzierung der	
Medium pH 5,7	+	16SrDNA ergab eine Ähnlichkeit von	
NaCl 2%	+	99,9% zu <i>B. licheniformis</i> .	
5%	+	Die phänotypischen Tests weisen	
7%	+	mit wenigen Abweichungen auf	
10%	+	<i>B. licheniformis</i> hin.	
Lysozym-Medium	+		
Säure aus (ASS)			
D-Glucose	+		
L-Arabinose	+		
D-Xylose	+		
D-Mannit	+		
D-Fructose	+		
Hydrolyse von			
Stärke	+		
Gelatine	+		
Casein	w		
Tween 80	+		
Esculin	+		

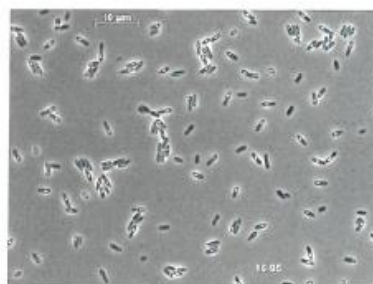


Abbildung A 3: Stammidentifikation der DSMZ für das Eigenisolat B1-7.

Leibniz-Institut
DSMZ-Deutsche Sammlung von
Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH



Identifizierung des Isolates GK16
(DSM ID 16-96)

24.03.16

Bacillus licheniformis

Eigenschaften des Stammes

Zellform	Stäbchen	Verwertung von	
Breite μm	0,7-0,8	Citrat	+
Länge μm	2,0-3,0	Propionat	+
Gramverhalten	+	Indolreaktion	-
Katalase	+	Phenylalanin-desaminase	-
Sporen	+	Arginindihydrolase	+
Anaerobes Wachstum	+	Nitratreduktion	+
VP Reaktion	+	Gasbildung aus Glucose	-
pH in VP-Medium	6,0	Lecithinase	-
Wachstum bei		ERGEBNIS: Isolat GK16	
40°C	+	= <i>Bacillus licheniformis</i>	
50°C	+	Das Profil der zellulären Fettsäuren ist	
55°C	+	typisch für dieses Taxon.	
Wachstum in		Die partielle Sequenzierung der	
Medium pH 5.7	+	16SrDNA ergab eine Ähnlichkeit von	
NaCl 2%	+	99,1% sowohl zu <i>B. licheniformis</i> als	
5%	+	auch zu <i>B. sonorensis</i> .	
7%	+	Die phänotypischen Tests weisen auf	
10%	-	<i>B. licheniformis</i> hin.	
Lysozym-Medium	+		
Säure aus (ASS)			
D-Glucose	+		
L-Arabinose	+		
D-Xylose	+		
D-Mannit	+		
D-Fructose	+		
Hydrolyse von			
Stärke	+		
Gelatine	+		
Casein	+		
Tween 80	+		
Esculin	+		

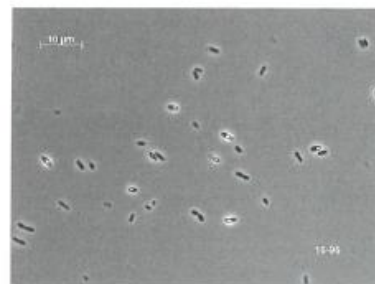


Abbildung A 4: Stammidentifikation der DSMZ für das Eigenisolat GK16.

Tabelle A 1: 2,3-BDO- + Acetoinausbeute und Acetatbildung von *B. licheniformis* DSM 8785 mit 16 verschiedenen Substraten als einzige Kohlenstoffquelle. Kultivierung in 96-Well MTP bei 39 °C, 700 rpm und einer Startsubstrat-konzentration von $56,7 \pm 4,1$ g/L.

Substrat	Zeit [h]	Substrat- verbrauch [%]	Acetate [g/L]	Ausbeute 2,3-BDO + AC [g/g]
D-Glucose	16	100	0,5	0,35
Saccharose	16	100	0,8	0,29
Cellobiose	16	100	0,5	0,38
Lactose	47	41	1,8	0,02
Glycerin	47	100	0	0,23
D-Xylose	47	47	3,6	0,19
Galacturonsäure	23	100	10,2	0,11
D-Fructose	16	100	0,3	0,37
L-Sorbose	47	15	1,8	0,02
L-Arabinose	23	100	0,8	0,33
D-Ribose	47	100	0	0,15
Gluconsäure	23	100	7,3	0,15
D-Mannose	16	100	0,8	0,37
L-Rhamnose	47	75	0,8	0,08
D-Galactose	24	48	2,4	0,11
Inulin	47	86	0,8	0,06

Tabelle A 2: 2,3-BDO- + Acetoinausbeute und Acetatbildung von *B. mojavensis* B-14698 mit 16 verschiedenen Substraten als einzige Kohlenstoffquelle. Kultivierung in 96-Well MTP bei 39 °C, 700 rpm und einer Startsubstrat-konzentration von $56,7 \pm 4,1$ g/L.

Substrat	Zeit [h]	Substrat- verbrauch [%]	Acetate [g/L]	Ausbeute 2,3-BDO + AC [g/g]
D-Glucose	16	82	3,5	0,33
Saccharose	16	100	2,2	0,27
Cellobiose	16	63	0,6	0,17
Lactose	47	18	0,4	0,01
Glycerin	47	62	0	0,13
D-Xylose	47	95	0	0,20
Galacturonsäure	23	57	2,8	0,01
D-Fructose	16	97	3,8	0,33
L-Sorbose	47	3	0,5	0
L-Arabinose	23	70	0	0,18
D-Ribose	47	51	0	0,11
Gluconsäure	23	76	4,2	0,09
D-Mannose	16	59	1.3	0,26
L-Rhamnose	47	47	0	0,08
D-Galactose	48	41	0,4	0
Inulin	47	100	0	0,15

Tabelle A 3: 2,3-BDO- + Acetoinausbeute und Acetatbildung von *B. atrophaeus* NRS-213 mit 16 verschiedenen Substraten als einzige Kohlenstoffquelle. Kultivierung in 96-Well MTP bei 39 °C, 700 rpm und einer Startsubstrat-konzentration von $56,7 \pm 4,1$ g/L.

Substrat	Zeit [h]	Substrat- verbrauch [%]	Acetate [g/L]	Ausbeute 2,3-BDO + AC [g/g]
D-Glucose	16	100	0,9	0,37
Saccharose	23	82	0,5	0,19
Cellobiose	47	66	0	0,01
Lactose	47	4	0	0
Glycerin	47	60	0	0,05
D-Xylose	47	100	0	0,12
Galacturonsäure	47	20	1,6	0,10
D-Fructose	23	100	1,9	0,33
L-Sorbose	47	14	0	0
L-Arabinose	47	100	0	0,11
D-Ribose	47	100	0	0,15
Gluconsäure	23	82	9,5	0,11
D-Mannose	16	100	2,8	0,32
L-Rhamnose	47	65	1,0	0,06
D-Galactose	48	12	0	0
Inulin	47	27	2,8	0

Tabelle A 4: 2,3-BDO- + Acetoinausbeute und Acetatbildung von *B. vallismortis* B-14891 mit 16 verschiedenen Substraten als einzige Kohlenstoffquelle. Kultivierung in 96-Well MTP bei 39 °C, 700 rpm und einer Startsubstrat-konzentration von $56,7 \pm 4,1$ g/L.

Substrat	Zeit [h]	Substrat- verbrauch [%]	Acetate [g/L]	Ausbeute 2,3-BDO + AC [g/g]
D-Glucose	16	100	0	0,31
Saccharose	16	100	0,4	0,27
Cellobiose	47	60	3,9	0,09
Lactose	47	85	2,0	0,09
Glycerin	47	83	3,9	0,20
D-Xylose	47	61	1,5	0,34
Galacturonsäure	23	96	10,7	0,08
D-Fructose	16	100	7,9	0,31
L-Sorbose	47	8	0	0,69
L-Arabinose	16	100	0	0,26
D-Ribose	47	98	3,7	0,35
Gluconsäure	16	100	10,7	0,19
D-Mannose	16	100	0	0,31
L-Rhamnose	16	100	0,7	0,17
D-Galactose	16	100	0	0,36
Inulin	47	23	0	0,22

Tabelle A 5: An- und Kationenkonzentration im Ultra- und Nanofiltrat.

Ionen	Ultrafiltrat:	Nanofiltrat:
	Konzentration [mol/L]	Konzentration [mol/L]
PO_4^{3-}	0,6	1,3
SO_4^{2-}	0,4	0,4
Ca^{2+}	0,5	44,0
Mg^{2+}	-	3,9
K^+	-	3,8
Na^+	0,9	2,2
Ionenstärke	5,0	105,6

Tabelle A 6: Spurenelementanalyse der drei Hydrolysate.

Element	Hydrolysat: Konzentration [mg/L]	Ultrafiltrat: Konzentration [mg/L]	Nanofiltrat: Konzentration [mg/L]
Al	0,3	0,6	1,1
B	0,3	0,3	0,4
Ba	1,5	3,2	6,3
Bi	u.N.	u.N.	u.N.
Ca	91,0	186,6	372,8
Cd	u.N.	u.N.	0,1
Co	n.d.	u.N.	u.N.
Cr	u.N.	0,1	0,1
Cu	0,3	1,1	2,2
Fe	1,3	4,0	3,8
K	71,9	106,3	154,3
Mg	25,1	48,4	104,1
Mn	11,9	22,8	48,0
Mo	n.d.	n.d.	u.N.
Na	2,6	3,8	7,1
Ni	0,1	0,2	0,7
P	9,1	8,4	36,0
Pb	u.N.	0,3	0,4
S	2,5	6,0	10,3
Se	0,2	0,1	0,3
Sr	0,4	0,8	1,7
Ti	u.N.	u.N.	u.N.
V	n.d.	u.N.	u.N.
Zn	2,4	6,2	13,7

u.N. – unterhalb der Nachweisgrenze (< 0,01 mg/L)

n.d. – nicht detektiert

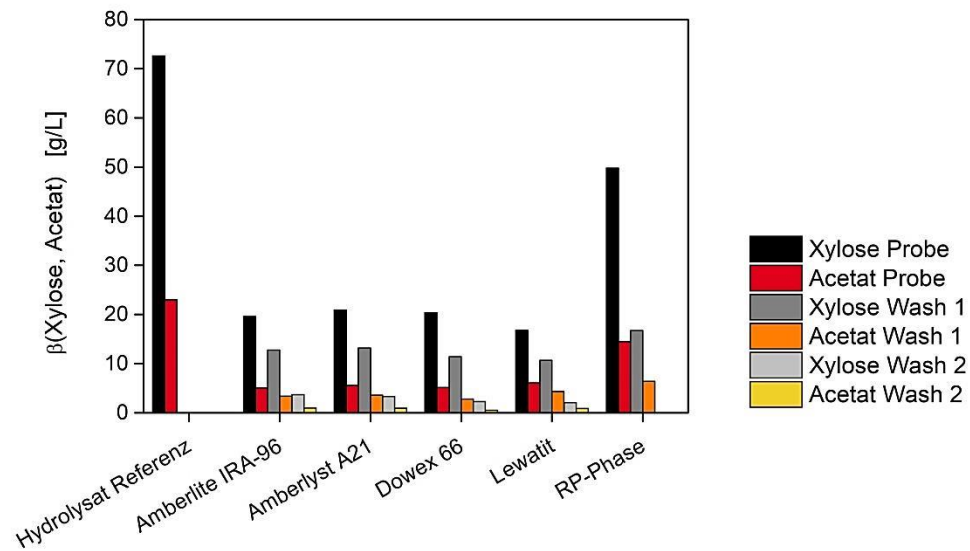


Abbildung A 5: Xylose- und Acetatkonzentrationen in den Anionentauscher- und RP-Phasenproben und in den jeweiligen Waschfraktionen (Wash) 1 und 2.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt PD Dr. rer. nat. habil. Ulf Prüße für die Überlassung des interessanten Themas und das mir entgegengebrachte Vertrauen sowie die zahlreichen Diskussionen, Anregungen und konstruktive Kritik, die maßgeblich zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen haben.

Frau Prof. Dr. Anett Schallmey möchte ich für die Übernahme des Koreferats danken und Herrn Prof. Dr. Udo Rau für die Übernahme des Vorsitzes in der Prüfungskommission.

Bedanken möchte ich mich auch bei Herrn Prof. Dr. Klaus-Dieter Vorlop und Frau Dr. Anja Kuenz für die enge Zusammenarbeit, die vielen Diskussionen und Anregungen.

Einen besonderen Dank möchte ich an Frau Elena Geisler für ihre tatkräftige Unterstützung und an Herrn Dennis Jäger für die Hilfestellung bei analytischen Problemen und Fragestellungen ausrichten.

Ein weiterer Dank geht an die Mitarbeiter des Thünen-Instituts für Agrartechnologie. An Cornelius Staude für die Projekt-Zusammenarbeit und die schöne Bürozeit. An Susan Krull und Dr. Silvia Brock für die hilfreichen Gespräche und all die Unterstützung im Labor und bei fachlichen Problemen. Des Weiteren danke ich den Mitarbeitern für das angenehme Arbeitsklima. Im Einzelnen: Sophia Dietel, Norman Kaufmann, Folkert Maas, Martin Ciaston, Laslo Eidt, Johannes Paas, Frank Brandes, Hans-Jürgen Helke, Jans Büüs und Dr. Thomas Willke.

Ich danke meinen Studenten und Praktikanten, die ich während meiner Promotionszeit betreut habe, für die gute Zusammenarbeit und die angenehme Arbeitsatmosphäre im Labor.

Ich bedanke mich bei allen Mitarbeitern des Verbundprojektes COSEPA für die Zusammenarbeit und der Lappeenranta University of Technology für die Zurverfügungstellung der Holz-Hydrolysate.

Der Fachagentur nachwachsende Rohstoffe e.V. danke ich für die finanzielle Unterstützung des Projekts.

Mein besonderer Dank gilt meiner Familie die mich immer unterstützt und mir Kraft gegeben hat und meinem Freund und zukünftigen Mann Dennis Jäger für die Unterstützung, Motivation und all die Geduld.